

脳 の シ ス タ チ オ ニ ン

第 III 編

脳機能 (in vivo) に及ぼす L-シスタチオニンの影響

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

松 田 清

〔昭和 36 年 2 月 24 日受稿〕

結 言

Tallan, Moore & Steinel¹⁾ により初めて報告された人脳内のシスタチオニンは、それが人脳及びそれに比較すれば少量ではあるが、猿脳等高等な精神神経機能を有する神経組織に特異的に多いが故に、これが存在と脳機能との間に何らかの関連があるのではないかという疑問を生む。例えば脳内遊離アミノ酸の大半を占めるグルタミン酸及びその代謝系路に列し、且つ生体でも脳にのみ見出される γ -アミノ酪酸 (以下 GABA と略称) 更に β -ヒドロキシ γ -アミノ酪酸 (以下 GABOB) 等の物質が、近年の脳生化学及び生理学的研究の進歩と共にその代謝の特異性に関連して脳機能に果す役割が次第に解明されつつある事を思えば²⁾⁻⁹⁾、シスタチオンについても同様の試みがなされてよいであろう。先に Gaitonde and Richter¹⁰⁾ は脳内でメチオニンからシスチンに至る代謝系路の存在を明らかにしたが、渡辺、森定¹¹⁾ らは脳が肝と異つてシスタチオニンの段階でこの代謝系路が長く停る可能性を実験的に立証し、これの脳内存在理由の一半を明らかにしたが、その存在目的については未だ説明はなされておらない様である。筆者は、グルタミン酸系に関する先人の例にならい、前報までにシスタチオニンの脳内侵入の問題及びこれが in vitro において脳組織呼吸に及ぼす影響について研究を加えたが、いづれも何ら、このアミノ酸の生理学的役割を示唆する如き成績を得る事は出来なかつた。少なくともこの意味ではシスタチオンを含む含硫アミノ酸は肝臓における如き強力な生化学的生理学的意義を脳に対して有していないようである。しかしながら一方において、これが飽くまでもヒト脳に多いという事と、特に生体全体の組織代謝に有力な影響を有するといわれているメチオニン、及びシスチンの中間に

存在している含硫アミノ酸であるという特異性を考えれば、直ちにこれを単なる夾雑物の如く見捨ててしまう事は怪挙に過ぎるようである。ここにおいて筆者は生理的には殆んどその脳中にシスタチオンを認めない猫、兎、マウス等に投与し、これが如何に薬理学的作用を演ずるかという点を、比較的中枢神経機能と関連があると思われる面について検討し、この問題に更に一步を進めんと試みた次第である。

実 験

I. 実験材料及び実験手技

L-シスタチオンは吉富製薬より提供されたもので、これは水に難溶であるから、前々報で血液脳関門通過実験で用いたと同様に、皮下静脈及び筋肉内に注射する際にはまず 0.5 N の塩酸で 200 mg を 10 cc の割合に溶解し、猫脳灌流血に注ぐ際は 50 mg を 10 cc の割合に溶解し、いづれも投与直前 1N の苛性ソーダを適量加えて中和せしめた。シスチン、メチオニンも略々同様の手段を用いた。対照として同量の無機塩を含む中性液を同液量投与した。マウスは従来通り岡山大学附属癌研マウスコロニーの Cb 系雄成熟マウス体重 25~30 g のものである。兎は成熟雄家兎である。猫の脳灌流実験手技については Geiger の原法¹²⁾ に若干の改良を加えたものでこれは池田の報告¹³⁾ に詳述されてあるので反復をさける。この灌流血に上記シスタチオン溶液を加え、シスタチオンは脳血流のみを通り、体循環とは無関係であるようにした。脳波記録装置は三栄測器製の四チャンネル及び八チャンネルのものである。

マウスに試みた電撃痙攣装置は Woodbury の原法¹⁴⁾ に多少の改良を加えたものである。マウスの中毒及び痙攣実験は同一の動物については少なくとも 3 日間の休養期間をとり、実験は週 2 回以下、実

験中及び休止期間は自由に食餌を与えた。

II. 実験成績

1) マウス急性及び慢性投与実験

L-シスタチオニン溶液を1群8匹のマウスにそれぞれkg体重当り100 mg, 200 mg, 500 mg 及び1000 mg を皮下注射し、投与後24時間にわたってその行動を観察したが、500 mg/kg 体重以上投与したものに、注射後30~120分頃軽い興奮状態を認めた以外著変を見ず、死亡した例はないし食餌量、飲水量も著変を見なかつた。又、この投与法を連日4週間にわたって行なつた場合も、行動、体重に変化を見なかつた。高濃度の溶液を調製する事が困難であるため追求出来なかつたが、L-シスタチオニンのLD₅₀は極めて高いと思われる。即ち、毒性は少なくとも急性投与及びこの程度の慢性投与では極めて弱いものであろう。

マウスの頭蓋内に2 mg (容量0.1 cc) を注入したものは、注射手技過誤によると思われる死亡例を除き全例一過性の強直性痙攣を来すがその後は何等の変化を認め得なかつた。

2) 兎及び猫灌流猫における血圧、呼吸、脳波への影響

ネンブタール0.7 g/kg の腹腔内注射により麻酔した体重2 kg 前後の成熟雄家兎の頭部及び頸部を剃毛後正中切開し、筋及び筋膜を剥離して頭蓋骨を露呈せしめ、これに図Iの位置に穿孔、導子をネジ込んだ。この方法は佐々木¹⁶⁾の猫皮質脳波測定を参考とした。術後数日間、摂食、自発運動など全く術前と変りない事を確認して後、無麻酔状態においてシスタチオニン100 mg を静注して脳波の変化を見たが、この際は注射手技による一過性の刺激状態を認めるのみで、対照に投与した無機塩液と何ら差異を認めなかつた。次に、再びこの兎をネンブタールで麻酔し、股動脈、気管を露出してそれぞれに呼吸、血圧測定装置に連結するカニユーレを挿入した。なお凝血防止には10 mg/kg のヘパリンを静注した。この状態で100~200 mg のシスタチオニンを耳静脈に1分間20 mg (1 cc) の速度で注入したが、呼吸血圧に著変なく(図I)、同条件でGABAを与えた際の血圧降下作用(図II)の如きものは見なかつた。しかるに脳波はこの際は投与数分にして対照に比し著しい覚醒を認めた(図III, IV)。猫は同様に麻酔したものをGeigerの原法に基いて手術的に脳循環を体循環と分離し、人工調節灌流血にシスタチオニン100 mg を加え、これが脳のみを循環するよ

うにした。脳波は兎と同様に皮質から誘導した。これでは、血圧、呼吸、血流量、脳酸消費量及び脳波共にシスタチオニン投与による影響を全く認めなかつた。

3) マウスのフェノバルビタール、クロールプロマジン等による麻酔にする影響

Cb系成熟マウスにフェノバルビタール15~100 mg/kg を皮下注射してそのTD₅₀を求め、次にシスタチオニン、メチオニン及びシスチンを各500 mg/kg 体重づつ前投与(フェノバルビタール投与30分前皮下注以下同様)せる場合の同様TD₅₀を求めた。中毒の判定はSwinyard, Brown & Goodman¹⁶⁾の規準に従つた。マウスは1群8匹づつとし、その各々に15 mg, 20 mg, 25 mg 以下100 mg まで5 mg づつの差を以つて段階的に増量したフェノバルビタールを投与したが、中毒状態を認めたのは40 mg 以上で、そのTD₅₀及びLitchfield & Wilcoxon¹⁷⁾による95%信頼限界は表1の通りである。又中毒症状でも、これをマウスが完全

表 1. フェノバルビタールのTD₅₀

条 件	TD ₅₀ (mg/kg 体重)	95%信頼限界
無 処 置	46.0	41.31~50.60
シスタチオニン	52.0	47.27~57.20
メチオニン	58.0	51.79~64.96
シスチン	62.5	54.82~70.95

入眠せる状態にある数について示せば表2の如くなる。更に24時間以内の死亡数を見ると表3の如くである。

表 2. フェノバルビタールによる入眠数

条 件	フェノバルビタール 60 mg/kg	75 mg/kg
無 処 置	3/8	8/8
シスタチオニン	0/8	3/8

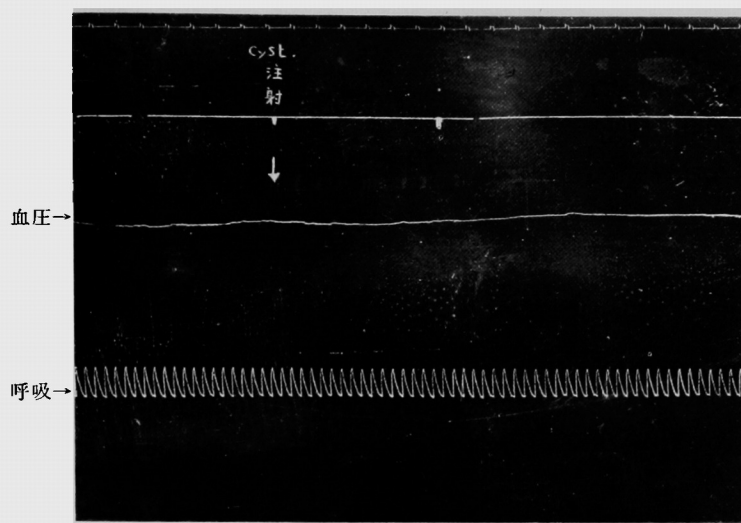
表 3. フェノバルビタールによる24時間後死亡数

条 件	フェノバルビタール 75mg	100mg
無 処 置	1/8	8/8
シスタチオニン	0/8	3/8

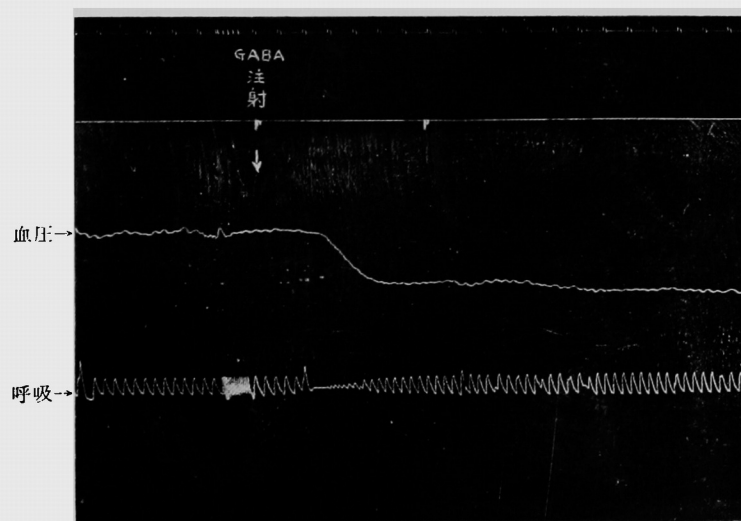
表に見る如くシスタチオニンを予め投与せる場合はマウスのフェノバルビタールに対する抗毒性は明らかに高くなっている。

クロールプロマジンについて行なつた同様の実験

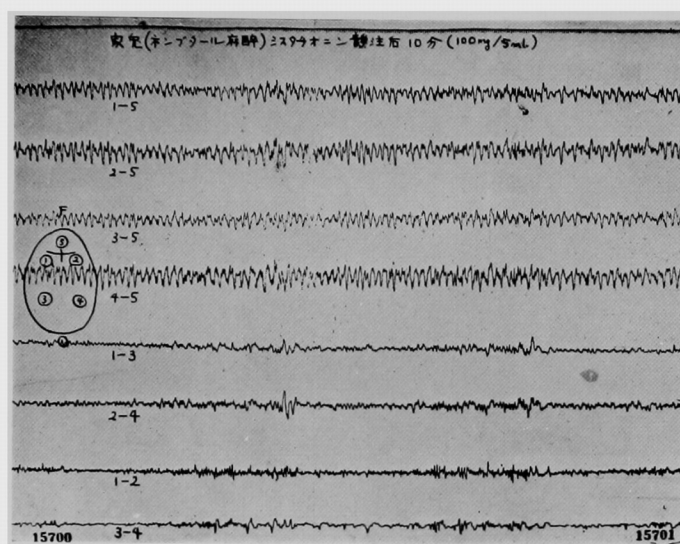
図Ⅰ シスタチオン投与



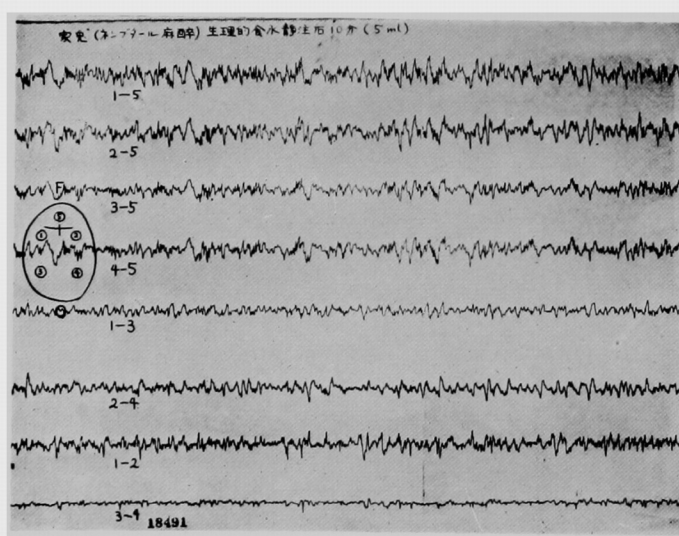
図Ⅱ GABA 投与



図Ⅲ シスタチオン投与



図Ⅳ 生理的食塩水投与



では、その差がフェノバルビタールによるもの程著明でなく、%で表現する事は困難であつたが、予めシスタチオンを投与したものでは麻酔の程度が浅く、殊にその覚醒が速やかで、これを24時間後の状態で見れば表4の如くである。

表 4. クロルプロマジン注射24時間後のマウス

Cp 量	Cp の み	Cp+シスタチオン
25 mg	死 亡 2/8 運動鈍 6/8	死 亡 8/0 快 復 8/8
25 mg	死 亡 7/8	死 亡 2/8

次にメトラゾール0.5%液の皮下注射、及びメチマイド (β - β -methylethyl glutarimide) 0.25%液の腹腔内注射によりマウスに起る最大痙攣即ち、後肢伸展を伴う痙攣と、最小痙攣即ち、5秒以上の前肢下顎等の摘搦を指標として、これに及ぼすシスタチオンの影響を観察した。

表 5. メソラゾール痙攣に対する影響

Mt量/kg	最 小 痙 攣		最 大 痙 攣	
	Mt のみ	Mt+シスタチオン	Mt のみ	Mt+シスタチオン
40 mg	0/8	0/8	0/8	0/8
50 mg	7/8	5/8	0/8	0/8
60 mg	8/8	5/8	3/8	2/8
70 mg	8/8	8/8	3/8	3/8

表 6. メチマイド痙攣に対する影響

Mg量/kg	最 小 痙 攣		最 大 痙 攣	
	Mg のみ	Mg+シスタチオン	Mg のみ	Mg+シスタチオン
8 mg	0/8	0/8	0/8	0/8
10 mg	4/8	3/8	3/8	3/8
12 mg	4/8	4/8	4/8	4/8
14 mg	7/8	7/8	6/8	6/8
16 mg	8/8	8/8	7/8	7/8
20 mg	8/8	8/8	8/8	8/8

表の如くこれら薬物の中枢興奮作用に対しては殆んど有意の差を認め難い。

4) 電撃痙攣に及ぼすシスタチオンの作用

① Maximal Electroshock Seizure

Woodbury & Davenport の装置を用いて、マウスの角膜電極を通じて 2000 V. 50 mA の電流を足踏スイッチにより 0.2 秒通電した。この方法によれば、動物の頭部抵抗の個体差による小さな変化は無

視し得る。この時起る最大痙攣のパターンは始め屈曲強直痙攣 (TE)，次いで伸展強直痙攣 (TE)，更に間代性痙攣 (CL) の順に進行する。その持続時間は Goodman¹⁸⁾ によれば TE 2.0 秒，TE 11.6 秒，CL 12.3 秒であるが、抗痙攣剤を与えてある場合は、TE のは縮乃至消失が起こり、それを以て抗痙攣作用強度の規準としているようである。筆者は 1 群 10 匹の Cb 系成熟雄マウスにシスタチオン 500 mg/kg を皮下注射し、10 分、30 分及び 60 分後に電撃を与えたが、全例に上記パターンの痙攣進行を認め、TE の消失は観なかつた。表に各相の継続時間を示すが、いづれも有意の差を認め得ない。

表 7. シスタチオン注射後の電撃痙攣

	対 照	10 分 後	30 分 後	60 分 後
TE	0.95±0.04	1.00±0.15	1.0±0.44	1.0±0.04
TE	13.9±1.10	15.0±1.29	13.1±1.01	14.5±1.12
CL	4.9±1.67	5.5±0.90	6.4±0.85	6.2±1.10

② 痙攣閾値 EST

マウスに 2～3 日間隔で電気刺激を与えて行くところある値の電流で一定の型の痙攣を起すようになる。これは数種のパターンに分けられるが、Submaximal seizure (SM) は痙攣は起きないが、Catatonic State を示し逃走しない。Minimal seizure (MS) は顔面、耳の間代性痙攣のみ、Submaximal seizure I (SMA 1) は前肢まで痙攣が及ぶ、SMA II は後肢に及び倒れる。最後は前述の Maximal seizure (MES) といった段階が通常用いられ¹⁹⁾、この内 MS を EST とされているようである。このように準備したマウスに薬物を与え、EST より 20%高い電流を与えて痙攣の起らない時に薬物に抗痙攣作用ありとする。そこで筆者は 1 群 10 匹 2 群の Cb 系雄成熟マウスの EST を求め、それぞれにシスタチオン 500 mg/kg 及び同量の塩液を皮下注射し前記 MES 実験から、もし抗痙攣作用がありとすればその Peak time となつている注射後 30 分 (TE がわずかに短縮) において、それぞれのマウスに EST 20%増し電流を与えた。

表 8. シスタチオン投与後の痙攣

	MS	SMA ₁	SMA ₂	MES
対 照	0/10	3/10	4/10	3/10
シスタチオン	0/10	4/10	4/10	2/10

表に見る如くこれでも抗痙攣作用を認めない。

③ フェノバルビタールの抗痙攣作用に及ぼす影響
前記の実験において、筆者はシスタチオニンがフェノバルビタールの中毒作用に対し拮抗的影響を与える事を見たが、これとは別に、Marrazzi²⁰⁾、高橋¹⁹⁾らの GABA の例にならい、フェノバルビタールの抗痙攣作用とシスタチオニンの関連について

MES を指標として実験して見た。

フェノバルビタール注射後 2 時間（効力の Peak time）に MES test を行なつたものと、フェノバルビタール注射後 1 時間半（上述シスタチオニン Peak time）にシスタチオニン 500 mg/kg を注射して 30 分後同様の test を行つたものを比較すると表 9 の通りである。

表 9. MES に対するフェノバルビタールの作用

フェノバルビタール量/kg		20 mg	25 mg	30 mg	40 mg
Ph+シスタチオニン	TE 消 失	2/8	5/8	7/8	8/8
Ph+無 機 塩	〃	6/8	3/8	8/8	8/8

表に見る如くシスタチオニンはフェノバルビタールの抗痙攣作用を助長する傾向があるが 25 mg では逆であり、これまた有意の差があるとは認め難い。

考 案

以上の実験成績を綜括するに、先づシスタチオニンは覚醒作用、換言すれば中枢神経に対し、何らかの刺激的效果を有するのではないかという仮定が可能のようである。即ち家兎における睡眠脳波を覚醒し、フェノバルビタール、クロルプロマジンによるマウスの麻酔に拮抗的作用を及ぼす。しかしその反面、大量にマウスに投与すればわずかに興奮が見られるのみで、非麻酔家兎の脳波に賦活的效果を与えず、電撃痙攣閾値を低めず、その強度も増強しない。又メトラゾール痙攣は逆にこれを低下しめる傾向さえある。又これを奥村¹¹⁾の人脳例について見ても、てんかん患者に特に多いという事はなく、GABA 等のアミノ酸の如く直ちに中枢作用との関連において前記覚醒作用を解釈するには多くの疑問が残るようである。一方、前報において筆者はシスタチオニンもまた血液脳関門の阻止により、血中量に比し脳には極めて微量しか侵入し得ない事を述べた。勿論、実験を繰返す内には Tower、塚田²⁷⁾らのいう如く、慢性的投与による脳内蓄積の可能性もないではないが、その代謝活性の低さを同時に考えるならば、脳内に侵入したシスタチオンが前述の如き著明な覚醒作用を与えるとは、この面からも考え難いものがある。

そこで今一度、シスタチオニンの生体に投与された際の代謝経路を考えて見ると、以上の成績は脳内シスタチオニンの働きと見るよりも、肝におけるシ

スタチオニンの代謝に関連して考えた方が、より自然のようである。du Vigneaud²²⁾ はシスチン欠乏食で飼育したネズミにシスタチオニンを与える事によりこれの成長をたすけ得たと報じたが、これは肝でシスタチオニンがシスチンに分解されるという意味で当然の現象である。同様の事は本報における実験にもあてはめ得る。即ち、筆者の見た覚醒作用はすべて投与したシスタチオニンが肝でシスチンとなりそれがフェノバルビタールその他に対して解毒的に働いた²³⁾ 結果であると解釈する事は自然である。猫脳灌流実験では体循環と分離されているため、肝を通過しないシスタチオニンが直接脳血流を大量に通つても何ら脳波上に覚醒効果を認めなかつたという事実は、更にこの解釈を裏づけるものであろう。又、メトラゾール、及びフェノバルビタールに相似した構造のメチマイドの痙攣作用に対して殆んど影響せず、フェノバルビタールの有する抗痙攣作用にもあまり変化を与えなかつたのは、これらの現象が麻酔、入眠、更には死亡に至るどちらかといえば緩慢作用に比し、急性の中枢作用であるためかと考えられる。

以上筆者の試みた一連の観察は、人脳に多いこのアミノ酸の存在意義に殆んど何らの解明を与え得なかつた。しかし、これを以て直ちにシスタチオニンが脳機能と関連をもたぬという証明にする事も勿論出来ない。ヒト、犬、或いは猫灌流猫に与えた GABA は著明な脳波変化を与え^{8,24)25)} ながら、これをネズミに投与してもその電撃痙攣に変化を及ぼさないという報告¹⁹⁾ や、システインも僅かながら Synaps に対して作用する²⁶⁾ といった報告等々、未だこれら諸種アミノ酸の中枢作用に関する実験方法には多くの検討すべき問題が残されているようであ

り、又それら相互の結びつけもなお一層の進歩が望まれるものである。

要 約

L-シスタチオニンを動物に投与してその生理作用を見た。フェノバルビタールその他の薬物に対しシスタチオニンは抗麻酔に働くようであるが、電撃痙攣、非麻酔時脳波には影響しない。これはシスタチオニンが先づ肝でシスチンとなり、しかる後に薬物に解毒的に働くためと解釈され、直接脳内に侵入

したシスタチオニンの中枢作用と考えられるような成績は得られなかつた。

終りに御懇篤なる御指導御校閲を賜わつた奥村教授に深甚の謝意を捧げると共に、終始御助言御指導載いた大月講師並びに実験に御協力下さつた教室員諸氏に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Tallan, H. H., Moore, S. and Stein, W. H. : J. Biol. Chem., **230**, 707 (1958).
- 2) Price, J. C., Waelsch, H. and Putnam, T. J. : J. A. M. A. **122**, 1153 (1943).
- 3) Hawkins, J. E. Jr. and Sarett, L. H. : Clin. Chim. Acta, **2**, 481 (1957).
- 4) Tower, D. B. : Progress in Neurobiology **I**, 182 (1958).
- 5) Tower, D. B. : Clin. Chim. Acta, **2**, 397 (1957).
- 6) Hagashi, T. : Nature, **182**, 1443 (1958).
- 7) 清水 : 臨床内科小児科 **14**巻, 5号 (1959).
- 8) 太田原 : 日本小児科学会雑誌 **64**巻, 2114 (1960).
- 9) 陣内他 : 精神神経誌 **61**巻, 606 (1959).
- 10) Gaitonde, M. K. and Richter, D. : Proc. Roy. Soc. Lond. Series B **145**, 83 (1956).
- 11) 奥村・大月 : 精神神経誌 **62**巻, 1801 (1960).
- 12) Geiger, A. and Magnes, J. : Amer. J. Physiol., **149**, 517 (1947).
- 13) 池田 : 精神神経誌 **63**巻掲載予定.
- 14) Woodbury, L. A. and Davenport, V. D. : Arch. int. Pharmacodyn., **92**, 97 (1952).
- 15) 佐々木 : 日本薬理学誌 **55**巻, 556 (1959).
- 16) Swinyard, E. A., Brown, W. C. and Goodman, L. S. : J. Rhamacol. & Exp. therap., **106**, 319 (1952).
- 17) Litchfied, J. T. and Wilcoxon, F. : J. Pharmacol., **96**, 99 (1949).
- 18) Goodman, L. S. et al. : J. Pharmacol. & Exp. therap., **108**, 168 (1953).
- 19) 高橋他 : 神経進歩 **4**巻, 511 (1960).
- 20) Marrazzi, A. S. : Science, **127**, 284 (1958).
- 21) 塚田 : 神経進歩 **4**巻, 525 (1960).
- 22) du Vigneaud, V., Brown, G. B. and Chandler, J. P. : J. Biol. Chem., **143**, 59 (1942).
- 23) 小田他 : 診療 **11**巻, 1102 (1958).
- 24) 石野 : 日本生理学誌 **22**巻, 907 (1960).
- 25) 山崎他 : 神経進歩 **4**巻, 497 (1960).
- 26) Purpura, D. P. et al. : J. Neurochem. **3**, 238 (1959).

Cystathionine in the Brain Tissue

Part 3. Influences of L-Cystathionine (In vivo) on the Physiological Function of the Brain

By

Kiyoshi MATSUDA

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

The author investigated physiological and pharmacological function of cystathionine that had been detected in the human brain. He studied changes of behavior, respiratory function, blood pressure, electroencephalogram, electroshock threshold and TD_{50} of several kinds of drugs after administration of L-cystathionine to mice, rabbits and cats whose brains were perfused through the isolated cerebral circulations.

L-cystathionine did not influence the behavior, respiration, blood pressure and electroshock threshold in the experiments with mice and rabbits. On the other hand, the counteractions of L-cystathionine to the toxic effects of phenobarbital and chlorpromazine were observed in the experiment of TD_{50} of such drugs and awaking signs on the EEG of the anaesthetized rabbits after L-cystathionine had been given. No significant effects of it, however, were observed on the EEG of anaesthetized rabbits or of the cats whose cerebral circulations had been isolated.

On the basis of these experiments and preceding reports, the author assumed as follows,

- 1) Almost all of the L-cystathionine administered to animals probably was metabolized rapidly to cystine in the liver tissue, and so increased cystine might work to counteract the toxic effects of phenobarbital and other drugs.
 - 2) A little amounts of L-cystathionine entered into brain through the blood-brain barrier hardly influences on the physiological functions of central nervous system.
-