

# 岡山医学会雑誌

第73巻 4, 5, 6合併号 (第797, 798, 799号)

昭和36年6月30日発行

612.822.1:577.158

## 痙攣による Aldolase 及び Transaminase の 変動に関する実験的研究

### 第 1 編

正常家兎および脳局所アナフィラキシー家兎  
大脳皮質の Aldolase 活性について

岡山大学医学部第一外科教室 (指導: 陣内傳之助教授)

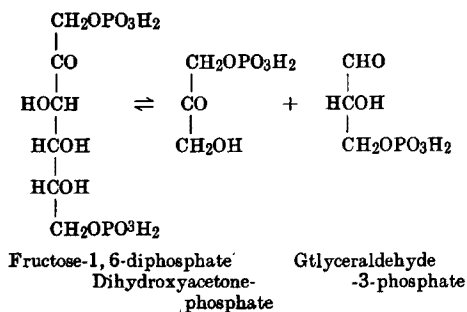
小 田 皓 二

〔昭和36年3月31日受稿〕

### 第1章 緒 言

Aldolase は、1934年 Meyerhof, Lohmann<sup>1)</sup>, に  
よつて発見せられた生体内糖分解過程に存する酵素  
であつて、Emden-Meyerhof 系における中間代謝  
物質である fructose-1, 6-diphosphate (FDP) を  
glyceraldehyd-3-phosphate と dihydroxyacetone  
phosphate とに分解する反応を触媒するものとせら  
れている (第1図)。

### 第 1 図



Aldolase は広く生物体内に含まれていることが  
明らかにさされている。すなわち Meyerhof,  
Lohmann<sup>2)</sup>, Warburg, Christian<sup>3)</sup>, Sibley, Le-  
hninger<sup>4)</sup>, Dounce, Tanhauser, Beyer<sup>5)</sup>, Meyer-  
hof, Wilson<sup>6)</sup> などはそれぞれ異なつた方法を用い  
て動物体内の Aldolase 活性を種々の生体臓器ある  
いは組織について測定しているが、いずれの研究者  
によつても骨格筋中に最も多く含まれ、ついで肝、  
脳、心等に多く含まれていることが明らかにされ  
た。

一方近年の酵素化学の発展に伴ない Aldolase と  
疾患との関係を追究した報告がかなり多くなされて  
いる。すなわち、1943年 Warburg, Christian<sup>3)</sup> が  
担腫瘍動物では血清 Aldolase (以下 ALD と記載)  
活性が著しい高値を示し、腫瘍の増大に比例して増  
加することを報告して以来にわかに注目をあびるよ  
うになつてきた<sup>5)7)8)9)10)</sup>。

筋疾患では本酵素は極めて特異的な態度を示しと  
くに進行性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症において  
は著明に上昇するが、上位 neuron の障害による筋  
萎縮では増加しないとされている<sup>11)12)13)</sup>。また心筋

梗塞では発病初期に著明に上昇することが報告されている。しかし冠不全では増量は認められず、梗塞時の活性の上昇は梗塞の程度に関連しており、これから疾患の予後の判定にあまり極めて重要であるといわれている<sup>14)15)16)</sup>。肝疾患においては急性肝炎の初期に著しく増量するが、肝硬変、閉塞性黄疸では殆んど変化を示さない<sup>17)18)19)</sup>。その他四肢の壊死、急性動脈閉塞等でも著しい上昇が認められている<sup>19)</sup>。進行性筋萎縮症、急性肝炎、心筋梗塞等についてみるに、この酵素が主要な解糖系酵素の1つであり、これらの臓器に本来多量に分布することを考え合わせると興味深い問題である。

他方、脳に関係したALDの研究は意外に少なく<sup>20)</sup>、Sibley, Lehninger<sup>4)</sup>がラットの脳ALD活性を測定し、Robins<sup>24)</sup>が猿の大脳皮質についてmotor areaよりvisual areaにALD活性の高いことを報告しており、さらにSibley, Fleisher<sup>22)</sup>が中枢神経疾患では血清ALDの上昇は認められないとのべているにすぎず、痙攣とALDとの関係を追及した研究は全く見当たらない。

さて、てんかん痙攣の病因については今日まで多くの研究がなされており、種々の説が発表されている<sup>23)24)25)26)27)28)</sup>。陣内は<sup>29)30)</sup>はこの解明に当り、てんかん素質、あるいは痙攣準備状態なるものを重視し、allergyにその根拠を求めんとして研究を続けてきた。すなわち実験的に動物に稀薄抗原をくりかえし注射することにより脳になら変化の認められない程度で、ごく弱い脳局所anaphylaxy（以下脳局アと略記す）を起させることにより、神経細胞の過敏状態、すなわち痙攣準備状態を与えることに成功し、これらの動物脳が痙攣準備状態を附与されたものであると主張してきた。われわれの教室では実験的てんかん症として脳局ア家兎を用い、種々の生化学的研究を進めているが今日までの知見として、glucose代謝の低下が著しいことのほか、hexokinase<sup>34)</sup>、Warburg-Dickens酸化系<sup>35)</sup>、TCA cycle<sup>36)</sup>のintermediateの酸化などの糖質代謝の低下が明らかにされている。さらにアセチルヒョリン代謝、アミノ酸代謝などの面からも広く検索が進められている<sup>45)46)</sup>。以上の知見に鑑み、正常家兎と対比しつつ脳局ア家兎脳のALD、とくにALD活性とアミノ酸との関係に重点をおいて検討を試みることにした。

## 第2章 実験方法

### 1. 実験動物

実験動物には体重約3 kg 前後の成熟家兎を用いた。

### 2. ALD活性の測定法

FDPにより生ずるTriose PhosphateをHydrazineと反応させてHydrazoneを生成せしめたのち、アルカリ処理を行ない、これにDinitrophenylhydrazineを作用させて発色し、比色定量を行なう。Sibley, Lehninger法のBruns法<sup>37)</sup>にもとずき、Beckmann光電比色計を用いて測定した。その方法を略記すれば次の如くである。

試薬：

- i) Fructose-1-6-diphosphate 0.06 M, pH 7.4
- ii) Hydrazine sulfate 0.56 M, pH 7.4
- iii) Iodacetate 0.002 M, pH 7.4
- iv) Collidin buffer (2,4,6-Trimethylpyridin) 0.1 M, pH 7.7
- v) 2,4-Dinitrophenylhydrazine
- vi) 10% Trichloroacetic acid
- vii) Sodium hydroxide 0.75 M

測定方法： 酵素液1 mlに1 ml Collidin buffer, 0.25 ml Hydrazine, 0.25 ml Iodacetate, 0.25 ml FDP溶液を加え37°Cに60分間incubateする。次にTrichloroacetic acid 3 mlを加え10分間放置後遠沈濾過する。この上清1 mlに0.75 NのNaOH 1 mlを加え室温に15分間放置する。ついで1 mlの2,4-Dinitro-phenylhydrazineを加え10分間38°Cの水浴中におき0.75 NのNaOHを加え総量を10 mlとする。10分後盲検の透過度を100%とし光電比色計Filter 540 mμで測定する。

### 3. 酵素液の作成法

家兎を正中断頭し、ただちに大脳半球をとりだし、氷冷後軟膜をはがし、皮質を白質より分離し、その200~500 mgを10 mlの1% KCl中で3分間homogenizeし、ガーゼで濾過した後測定に供した。測定にさいしては稀釈倍率を2種作り、それらの平均値をとった。組織のALDは湿性重量g当りの値で表わした。以上の操作はすべて一貫して可及的速やかに行なつた。

### 4. 標準実験系に添加するアミノ酸

- i) 0.2 M L-Glutamic acid (和光純薬製)
- ii) 0.2 M L-Glutamine (〃)
- iii) 0.2 M L-Aspartic acid (〃)

iv) 0.2 M L-Asparagine (〃)

v) 0.2 M  $\gamma$ -Aminobutyric acid (第一化学製)

### 5. 脳局ア家兎の作成法

潜在性脳局ア家兎の作成法には、体重 2.5 kg 以上の白色成熟家兎を用い、新鮮牛脳灰白質加牛血清を抗原とする笠井の方法<sup>38)</sup>によつた。すなわち新鮮な牛脳の灰白色をとり、これを乳鉢で泥状とし、5～6 倍量の局方アルコールを加えて時々振盪、攪拌し、1 週間室温に放置した後、遠心分離して上清をコルベンにとり、減圧のもとでアルコールを蒸発すると黄褐色の粘調な残渣となる。これをエーテルで溶かし、しばらく放置して上清をとり、これに多量のアセトンを加えると白色沈澱物をうる。ついで白色沈澱物のアセトンを除き乾燥し、ふたたびエーテル、アセトンを加え以上の操作をくり返す。この白色沈澱物は磷脂質を含む。他方新鮮な牛血液を数時間室温に放置した後遠沈して血清を分離し、54°C 30 分間重濃煎で非動化する。この非動化血清 2 ml にさきの白色沈澱物、すなわち牛脳灰白質磷脂質 10 mg の割合で混合し、新鮮牛脳灰白質加牛血清のエムルジョンを作つた。感作の方法は家兎の耳静脈内に pro kg 2 ml の上記のエムルジョンを 2 回、2 日連続注射し、12 日後にそれぞれ Arthus 反応を行ない、反応陽性のものに pro kg 1 ml 宛のエムルジョンを 2 週間間隔で 5 回注入した。

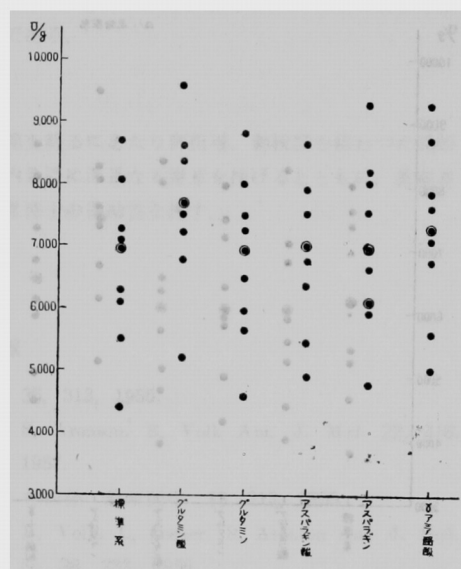
## 第 3 章 実験成績

正常家兎大脳皮質 ALD, およびそれに及ぼす脳の遊離アミノ酸である, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, GABA の影響をしらべ、次の如き成績をえた。すなわち、標準実験系においては第 1 表、第 2 図の如く、ALD 活性値はかなりの動揺を示し、最高 8,710、最低 3,820 で平均 6,900 U/g であつた。ついでこれに glutamic acid を附加した場合は標準系に比して平均 7% の活性の増加を認めた。つぎに glutamine を附加してみたが標準実験系と殆んど有意の差を認めなかつた。aspartic acid, asparagine の添加でも又殆んど標準系と有意の差を認めない。GABA を加えた場合やや促進の傾向を認めた。すなわち glutamic acid が最も促進的に働き、ついで GABA がやや促進するようであるが、glutamine, asparagine, aspartic acid は影響を与えないようである。またいづれの

第 1 表. 正常家兎大脳皮質 ALD 活性に及ぼすアミノ酸の影響 (U/g)

|       | 標準系   | glutamic acid | glutamine | aspartic acid | asparagine | GABA  |
|-------|-------|---------------|-----------|---------------|------------|-------|
| No. 1 | 8,710 | 7,110         | 8,040     | 8,080         | 9,510      | 8,160 |
| No. 2 | 7,640 | 8,250         | 7,480     | 8,400         | 8,290      | 8,710 |
| No. 3 | 7,370 | 5,910         | 7,190     | 6,330         | 7,660      | 7,310 |
| No. 4 | 6,020 | 6,760         | 6,410     | 6,520         | 7,670      | 7,330 |
| No. 5 | 5,440 | 5,550         | 5,920     | 5,710         | 7,360      | 6,110 |
| No. 6 | 5,250 | 5,260         | 5,800     | 5,120         | 6,750      | 6,310 |
| No. 7 | 4,660 | 4,010         | 4,990     | 3,910         | 5,220      | 4,580 |
| No. 8 | 3,820 | 4,520         | 4,270     | 4,860         | 5,250      | 5,010 |

第 2 図 正常家兎大脳皮質 ALD に及ぼすアミノ酸の影響



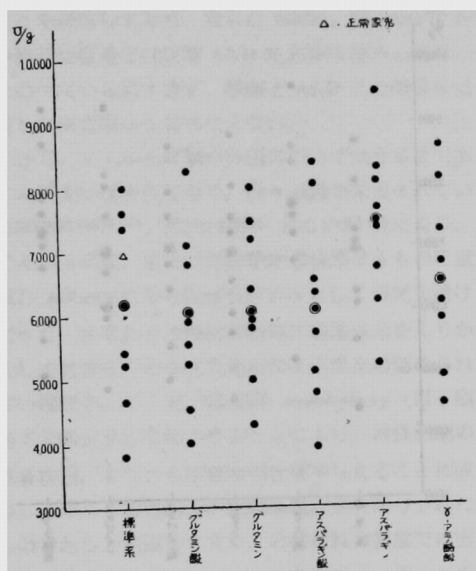
添加アミノ酸でも抑制的に作用することはなかつた。

次に潜在性脳局ア家兎の大脳皮質 ALD 活性を測定するに、第 2 表、第 3 図の如く、最高 8,010、最低値 3,810、とかなり動揺し、平均 6,200 U/g であつた。これは前述の正常家兎の例に比し平均値において 11% の活性値の低下を示している。以下標準実験系に各種アミノ酸を添加してその影響をみるに、glutamic acid, glutamine ではほとんどその影響はみられない。また aspartic acid でも影響がみられないが、asparagine ではその添加により 17% とかなりの促進がみられる。また GABA は僅かではある

第2表. 脳局ア家兎大脳皮質 ALD 活性に及ぼすアミノ酸の影響 (U/g)

|       | 標準系   | glutamic acid | glutamine | aspartic acid | asparagine | GABA  |
|-------|-------|---------------|-----------|---------------|------------|-------|
| No. 1 | 8,010 | 7,140         | 8,000     | 8,080         | 9,510      | 8,140 |
| No. 2 | 7,630 | 8,250         | 7,220     | 8,400         | 8,310      | 8,650 |
| No. 3 | 7,360 | 5,920         | 7,200     | 6,340         | 8,090      | 6,800 |
| No. 4 | 6,010 | 6,790         | 6,410     | 6,550         | 7,360      | 7,330 |
| No. 5 | 5,420 | 5,250         | 5,920     | 5,120         | 7,500      | 5,940 |
| No. 6 | 5,230 | 5,560         | 5,800     | 5,700         | 6,750      | 6,170 |
| No. 7 | 4,660 | 4,000         | 4,980     | 3,930         | 6,200      | 4,580 |
| No. 8 | 3,810 | 4,510         | 4,270     | 4,760         | 5,210      | 5,000 |

第3図 脳局ア家兎大脳皮質 ALD に及ぼすアミノ酸の影響



が促進的傾向が伺われる。

以上の如く、脳局ア家兎の場合では正常家兎において最も促進せしめた glutamic acid 添加の場合にほとんど影響を認めず、また正常家兎では全く変化を認めなかつた asparagine 添加の場合に最も著明な促進が認められるという結果を得た。

#### 第4章 考 按

脳 ALD 活性を示すには湿性重量 g 当りの値を用いたが、正常の場合にも相当の範囲の動揺を示した。これは呈色の僅かな条件でも左右されることが多いからであろう。ALD 活性に対しては pH が

大いに関係する。これは酵素一般についてもいえることであるが、酵母の ALD は焦性磷酸塩や cysteine によつて阻害され、また青酸塩によつても阻害されることが知られている<sup>39)</sup>。cysteine による阻害は重金属イオンによつて除去され、さらに活性化されるという<sup>40)</sup>。一方筋 ALD は焦性磷酸塩、cysteine, glutathione によつては阻害されず<sup>41)</sup>、Warburg 等が筋肉からえた結晶状 ALD は重金属イオンがなくとも活性であるとされている。また酵母と筋とは ALD に相違があると考えられており、私は ALD に及ぼす他の因子を求めて検索を進めた訳であるが、脳の ALD に関する私の実験では glutamic acid が ALD 活性を促進すること、また軽度ながら GABA も促進作用を有することを明らかにした。

山本<sup>42)</sup>は脳に遊離して存在する種々のアミノ酸の脳の解糖に及ぼす影響をしらべ、glutamic acid などが解糖を促進させることをみており、山田<sup>34)</sup>は hexokinase に対しても glutamic acid などが促進的に働くとのべている。これらのことを考え合わせると、glutamic acid は解糖系一般に促進的に作用するように考えられる。一方 GABA は脳内では transamination により容易に glutamic acid に変化し得るので、GABA が glutamic acid に変化して効果を示すのではないかと考えられる。これらの事実の解明に対しては、さらに今後の検討が要求されるところである。

次にてんかん素因、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脳局ア家兎大脳皮質 ALD 活性を測定し、正常家兎のそれと比較検討したところ、脳局ア家兎では ALD 活性がかなり低下していることを知った。教室の清水<sup>31)</sup>、兼松<sup>32)</sup>、山田<sup>34)</sup>、樋口<sup>35)</sup>らは Embden-Meyerhof の解糖系における糖代謝が脳局ア家兎では一般に低下していることを報告している。

すなわち、清水<sup>31)</sup>は断頭家兎保生脳灌流装置により、glucose, pyruvate を附加した灌流実験を行ない、解糖、呼吸を含めた aerob の糖代謝をみたのであるが、これによると正常家兎群に比較して glucose, pyruvate の消費が少なく、糖代謝の抑制されていることを認めた。兼松<sup>32)</sup>は脳局ア家兎ならびにてんかん患者の脳皮質切片を用い、Warburg 検圧計により glucose を基質として解糖作用をしらべた in vitro の実験において、いずれの場合も正常例に比して抑制の傾向にあることを明らかにしている。

また山田<sup>34)</sup>は hexokinase の低下をのべ、樋口<sup>35)</sup>

は大脳皮質の mitochondria で TCA cycle における糖代謝を酸素消費量の面より観察して代謝の低下を認めている。さらに脳局ア家兎において小野田<sup>35)</sup>は Warburg-Dickens 系においても代謝の抑制がみられることを報告している。これらの実験と私の成績とを併せ考えると、脳局ア家兎では正常家兎に比較して、糖代謝に属する酵素系の活性は一般に低下しているのではないかと考えられる。この事実は脳局ア家兎とてんかん患者脳が類似していることから、真性てんかん患者脳における糖代謝を推論する上に意義あるものではなからうか。

つぎに asparagine および GABA による活性化の問題であるが、Tower<sup>43)44)</sup>は人脳についての研究により、てんかん脳と正常脳との差の一つとして glutamic acid の代謝障害をあげ、これが asparagine によつて正常に復すること、さらに GABA にもこの作用のあることを明らかにしている。

私の実験における ALD 活性に関する成績もこれを裏付ける結果を示している。勿論てんかん脳と脳局ア家兎脳との相違もあり、同一の機転によると断定することは出来ないが興味ある事実と思われる。また正常家兎においては glutamic acid 添加が ALD 活性を促進せしめるが、脳局ア家兎に対してはほとんど影響を与えない点は興味あることで、すなわちてんかん脳においては glutamic acid の代謝に障害

があるという Tower の説に関係づけられるかも知れない。

## 第5章 結 論

正常家兎および脳局ア家兎（実験的てんかん家兎）の大脳皮質 ALD 活性を Bruns 法により測定し、これに及ぼす諸種アミノ酸の影響をしらべ次の結論をえた。

1) 脳局ア家兎では正常家兎に比較して大脳皮質 ALD 活性は低下している。

2) 正常家兎脳 ALD 活性に対しては glutamic acid が促進的に働くが asparagine は影響がない。

3) 脳局ア家兎脳 ALD 活性に対しては asparagine が促進的に働くが glutamic acid は影響がない。

4) 正常家兎、脳局ア家兎ともに大脳皮質 ALD 活性に対し  $\gamma$ -aminobutyric acid はやや促進的に作用するが、glutamine, aspartic acid はほとんど無影響である。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜わつた恩師陣内教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、教室森昭胤博士の御助言を謝す。

## 文

- 1) O, Meyerhof. K, Lohmann Biochem Z 271, 89, 1934.
- 2) O, Meyerhof. K, Lohmann Biochem Z 273, 413, 1934.
- 3) O, Warburg. W, Christian Biochem Z 314, 399, 1943.
- 4) G, Sibley. L, Lehninger J. Biol. Chem 177, 859, 1949.
- 5) A, Dounce. G, Tanhauser-Beyer J. Biol. Chem 173, 160, 1948.
- 6) O, Meyerhof. J, Wilson Arch. Biochem 12, 22, 1949.
- 7) G, Sibley. L, Lehninger J. Nat. Cancer. Dnrt 9, 303, 1953.
- 8) 大本：北海道医誌. 29, 1421 昭29.
- 9) R, Baker. D. Govan. Canrer Res 13, 141, 1953.
- 10) 松尾：日消会誌 53, 374, 昭31.
- 11) G. Schapira. J, Dreyfws Am. J. phys. med.

## 献

- 35, 313, 1955.
- 12) S, Aronson. B, Volk Am. J. Med. 22, 416, 1957.
- 13) 杉田他：最新医学 13, 213, 昭33.
- 14) B, Volk. L, Losner. S, Aronson Am. J. Med. Sc. 38, 232, 4956.
- 15) 田坂他：日循会誌 22, 266, 昭33.
- 16) 吉利：医学のあゆみ 26, 756, 昭33.
- 17) F, Bruns. W. Puls Klin. Wschr 32, 656, 1954.
- 18) F, Bruns. J, Neuhaus Arch. Biochem 65, 588, 1955.
- 19) 山城：外科の領域7, 1525, 昭34,
- 20) 坂田：日本医事数報 1. 881, 122, 昭35,
- 21) E, Robins J. Neurochem 1. 68, 1956.
- 22) G, Sibley, G, Fleisher Proc Staff Meet Mayo Clinic 29, 591, 1954,
- 23) O, Förster; Dtsch. Z. Nervenheilk. 94, 15, 1926,

- 24) 内村：脳と神経 3, 9, 昭26
- 25) H, Fischer. J, Thurzo. Zbl. ges. Neurol. Psychiat 43, 707, 1926.
- 26) 宮川：熊本医誌 14, 1999, 昭13.
- 27) 宮川：精神神経会誌 44, 325, 昭15.
- 28) E, Bigwood; Zbl. ges. Neurol. Psychiat. 38, 470, 1924.
- 29) 陣内：日本臨床 9, 1121, 昭26,
- 30) 陣内：脳神経領域 5, 355, 昭27,
- 31) 清水：岡山医誌 65, 1159, 昭28.
- 32) 兼松：岡山医誌65, 1271, 昭28.
- 33) 宇都宮：岡山医誌 65, 1345, 昭28.
- 34) 山田（岡山医誌 71, 779, 昭34.
- 35) 小野田：岡山医誌 71, 851, 昭34.
- 36) 樋口：岡山医誌 70, 昭34
- 37) F, Bruns Biochem. Zschri 325, 156, 1954.
- 38) 笠井：岡山医誌 64, 1587, 昭27.
- 39) O, Warbmig. W, Christian Biochem Z 314, 149, 1943.
- 40) R, Bard J, Bact 59, 387, 1950.
- 41) O, Warburg. W, Christian Biochem Z 311, 209, 1942.
- 42) 山本：岡山医誌 71, 305, 昭34
- 43) D, B Tower Neurology 5, 113, 1955.
- 44) D, B, Tower Clinica Chimica acsc 2, 395, 1957.
- 45) 陣内他：日新医学 45, 1, 昭33.
- 46) 陣内他：神経研究の進歩 4, 531, 昭35

---

## Experimental studies on aldolase and transaminase activities in rabbits with convulsions

### Part I On Aldolase activities in the cerebral cortex of rabbits

By

Koji Oda, M.D.

First Dept of surgery, Okayama University, Medical school  
(Director: Prof. Dr. D. Jinnai)

The aldolase activities in the cerebral cortex of normal rabbits and rabbits with latent cerebral local anaphylaxis (LC LA) were measured by using Bruns' method, and influences of glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, and  $\gamma$ -aminobutyric acid on the aldolase activities were evaluated. It has been experimentally probed that LCLA is an epileptic disposition and a state of arrangement of convulsion. The results were as follows.

- 1) The aldolase activity in the cerebral cortex of rabbits with LCLA is decreased, compared with that of normal rabbits.
  - 2) Glutamic acid accelerates the activity of the cerebral aldolase of normal rabbits.
  - 3) Asparagine accelerates the activity of the cerebral aldolase of LCLA rabbits.
-