

岡山醫學會雜誌

第 69 卷 10 号 (744号)

昭和32年10月31日発行

612.82 : 612.398

脳 の 窒 素 代 謝

第 2 篇

正常大黒鼠脳髓アンモニア並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)

河 井 清

〔昭和32年9月7日受稿〕

緒 言

脳・神経組織とアンモニアについては、田代の研究¹⁾を始めとし、Richter and Dawson²⁾, Geiger et al.³⁾, Bülow and Hohmes⁴⁾, Krebs et al.⁵⁾, Winterstein⁷⁾, Weil-Malherbe⁸⁾, Dickens and Greville¹²⁾, Conway¹³⁾, 塚田の研究¹⁷⁾等、多くの発表があり、これらは何れも、アンモニアの生理的意義を重視し、これが脳の機能と密接な関係があることを述べている。アンモニアが死後爆発的に増量することは古くから知られている事実であるが、さて生体におけるアンモニアの意義、生理作用その源泉、或は、これが、脳の如何なる状態に伴つて増加するかということになると充分判つてはいえない¹⁰⁾。唯、刺戟に伴つて、或は、脳の機能亢進に伴つて増加するといわれている位である。

アンモニアと関係の深いグルタミン酸については、Krebs et al.⁵⁾, Weil-Malherbe⁸⁾, を始めとし、Nachmansohn²³⁾, Awapara²⁴⁾, Wingo²⁶⁾, Roberts and Frankel²⁶⁾²⁷⁾, Wael-sch²⁸⁾ 等やはり多くの研究がある。グ酸は、

脳髓遊離アミノ酸中、主位を占めるものであり、その脱炭酸によつて生ずる γ アミノ酪酸²⁵⁾、並に、これと、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せると、脳髓遊離アミノ窒素の約70%を占めるとされている¹⁰⁾。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¹⁰⁾、脱炭酸をうけて前述の γ アミノ酸となる外、酸化的脱アミノを受けてアンモニアを放出、 α ケトグルタル酸となり、tricarboxylic cycle に入り得ると云う脳の機能に重大な関係を有するものであると考えられている。又、先にのべた脳のアンモニアにしても、glutamic acid-glutaminase system に依存しているという人⁶⁾もあるように、一方では、アンモニアイオンの結合と解離に関係し、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つていのである。

さて、私はすでに第1篇において、精神病患者髄液のアンモニア窒素量を測定し、これが脳の異常亢奮に際して増量することを推察したのであるが、更に、脳のアンモニア、並にこれと関係の深いグ酸、 γ アミノ酪酸等

を併せ測定し、それら相互の量的関係、及び、それらが、精神医学と関係の深い種々の処置によつて、如何に変動するかを検討する為に以下の実験を行い、結果を得たので、ここに報告する。本篇においては、正常大黒鼠のアノモニア、及びアミノ酸について行つた *in vivo* 並びに *in vitro* の実験について述べる。

実験方法

〔I〕 アノモニア量の測定¹³⁾

摘出した大黒鼠脳髓を秤量、氷冷せる10%三塩化酢酸水溶液を用いて、10倍 homogenate を作り、これを5分間遠心沈澱（1分間2500回転）し、予め外室え、飽和炭酸カリ液1.0 cc 内室えは、N/1000 塩酸1.0 cc を入れて準備した Conway unit の外室え、その上清液をピペットで正確に0.5 cc 秤量する。外室の内容を混合し、unit を1時間静置し、吸収せしめた後、内室の塩酸を水平マイクロビュレットより N/468 水酸化バリウムを以て滴定する。同様の操作を盲検として、10%三塩化酢酸水溶液についても行う。何れの場合も、一次標準としては、硫酸アノモニウム標準液を測定しておき、これと照し合わせて、アノモニア量を定めた。

〔II〕 アミノ酸測定²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾

摘出脳髓を秤量、75%アルコールを用い15

倍の homogenate を作り、その1.0 cc をとり、更に30倍容量の75%アルコールを加え²⁵⁾、共栓付遠沈管に入れ、充分振盪の後、遠沈、extract をとり、重盪煎上に蒸発乾固し、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、遠心沈澱し、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に供した。濾紙は東洋濾紙、No. 51 (40×40cm) を用い、原点に試料を毛细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²⁶⁾、室温にて、上昇法展開を行い、送風乾燥後、0.1%ニンヒドリンブタノール溶液を噴霧²⁶⁾、風乾後、93°C に30分保ち発色させた²⁶⁾。現われたアミノ酸呈色斑を切りとり、5.0 cc の再蒸溜水を加え、得られた呈色液を570 mμで、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の呈色斑より得た標準グラフ、と照し合わせてアミノ酸量を定量した。

実験結果

〔I〕 *In vivo* の実験。先づ、アノモニア、並に、アミノ酸を出来る限り生体に近い条件で、しかも、比較的簡単に行いうる術式を求める目的を以て、以下の実験を行つた。

第1表は、大黒鼠（体重100～200 g）を液体室素内に落下せしめ、脳髓の内部まで完全

第1表 液体室素に投入

例数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均
アノモニア量 mg%	1.02	1.20	1.26	2.10	0.78	0.60	1.08	1.02	0.42	1.05

に凍結されるのを待つて取り出し、頭蓋骨を割り、脳髓を摘出、秤量、氷冷せる10%三塩化酢酸水溶液を用い homogenize したもののついでのアノモニア量である。最低0.42 mg%最高2.10 mg%であり、9例の平均は、1.05 mg%であつた。

又、第2表は、上述の方法により得たアミノ酸であるが、表に示されているように、グルタミン酸は、5例平均、140.9 mg%，グルタミンは92.3 mg%，γアミノ酪酸は、

27.7 mg%であつた。

第2表 液体室素に投入

	グルタミン 酸量 mg%	グルタミン量 mg%	γアミノ酪 酸量 mg%
1	140.3	87.7	32.4
2	106.1	60.2	25.7
3	143.7	93.8	21.7
4	181.8	118.6	35.3
5	132.4	101.2	23.4
平均	140.9	92.3	27.7

次に、術式を変え、大黒鼠を台上に固定し、開頭、生体のまま手早く脳髄を摘出、直にドライアイスアセトン冷剤中に投入、凍結せしめ、これを秤量、同じく、10%三塩化酢酸水

溶液をもつて homogenize したものについて、アンモニア並にアミノ酸を測定してみた。

第3表は、この方法により得られたアンモニア量であるが、最低、0.33 mg%最高

第3表 開頭脳摘出と共にドライアイスアセトンにて凍結

例 数	1	2	3	4	5	6	7	平 均
アンモニア量 mg%	0.33	1.20	0.72	0.72	0.54	0.36	0.60	0.64

1.20 mg%であり、7例の平均は0.64 mg%であつた。

次に、第4表に示すように、アミノ酸では、

第4表 開頭脳摘出と共にドライアイスアセトンにて凍結

例 数	グルタミン酸量 mg%	グルタミン量 mg%	γアミノ酪酸量 mg%
1	181.5	72.8	
2	209.7	110.3	49.5
3	121.5	77.6	42.3
4	114.2	99.8	43.7
5	110.1	45.3	10.2
6	191.0	136.5	27.5
7	137.2	112.5	27.5
8	177.0	87.1	51.7
9	177.0	109.5	36.7
10	180.0	94.5	49.5
平 均	159.9	94.6	37.2

グルタミン酸は、10例平均159.9 mg%，グルタミンは94.6 mg%，γアミノ酪酸は、37.2 mg%であつた。

〔II〕 In vitro の実験.

成熟大黒鼠（体重100～200 g）を断頭、脳髄を摘出、Krebs-Ringer 液中に入れ、安全剃刀の刃を用いて厚さ0.2～0.4 mm、重量30～50 mg の切片を作る。これを基質を含まな

い、Krebs-bicarbonate-Ringer 液に浮遊せしめ、38°C、Warburg 円錐状容器中にて、4時間半、空気中にて incubate した。一定の時間後の外液のアンモニア、及び脳切片のアミノ酸量の消長を測定した。各の数値を第5表以下に現わす。値は健常鼠について行つた4例の平均である。

第5表は、大黒鼠脳スライスのアンモニア

第5表 大黒鼠脳切片のアンモニア発生

経過時間	1	2	3	4	4.5
アンモニア量 μM/g	5.1	7.3	13.8	13.6	18.9

発生量を外液について測定したものである。

表に示すように、最初の1時間で、5.1 μM/g、2時間で、7.3 μM/g、3時間で13.8 μM/g、4時間で、13.6 μM/g、4時間半で、18.9 μM/gであつた。単位時間毎の増加を見るに、第8表に示すように、最初の1時間では、5.1 μM/g、次の1時間では、2.2 μM/g、次の1時間では、6.5 μM/g、次の1時間では増加はみられず、次の30分間では、5.3 μM/gと、また著明な増加が見られる。つまり、最初の1時間、2時間目から3時間目迄の1時間、更に4時間目以後が、アンモニア増加が著明であつた。

次に第6表では、大黒鼠脳スライスのアミ

第6表 大黒鼠脳切片のアミノ酸の消長

経過時間	0	1	2	3	4
グルタミン酸量 μM/g	8.9	5.6	3.2	2.7	1.6
グルタミン量 μM/g	6.2	3.4	2.3	1.4	3.3
γアミノ酪酸量 μM/g	3.1	4.3	2.9	2.0	2.3
アスパラギン酸量 μM/g	3.5	3.8	3.1	3.1	0.9

ノ酸の時間的消長を示す。これを見ると、変化の著明なのはグルタミン酸であつて、最初の1時間で、 $8.9 \mu\text{M/g}$ から、 $5.6 \mu\text{M/g}$ と、 $3.3 \mu\text{M/g}$ の減少、2時間目には、更に $3.2 \mu\text{M/g}$ となり、 $5.7 \mu\text{M/g}$ の減少、3時間目には $2.7 \mu\text{M/g}$ となり $6.2 \mu\text{M/g}$ の減少、4時間目には $1.6 \mu\text{M/g}$ となり、 $7.3 \mu\text{M/g}$ の減少を示している。この間の関係を第7表に

第7表 アンモニア並にアミノ酸の増減

増減 $\mu\text{M/g}$ \ 時 間	1	2	3	4
アンモニア	+5.1	+7.3	+13.8	+13.6
グルタミン酸	-3.3	-5.7	-6.2	-7.3
グルタミン	-2.8	-3.9	-4.8	-2.9
γ アミノ酪酸	+1.2	-0.2	-1.1	-0.8
アスパラギン酸	+0.3	-0.4	-0.4	-2.6

示しておく。

次に、これを、単位時間毎に検討してみるならば、第8表のようになる。

第8表 単位時間におけるアンモニア並にアミノ酸の増減

増減 $\mu\text{M/g/hr}$ \ 時 間	1	2	3	4
アンモニア	+5.1	+2.2	+6.5	-0.2
グルタミン酸	-3.3	-2.4	-0.5	-1.1
グルタミン	-2.8	-1.1	-0.9	+1.9
γ アミノ酪酸	+1.2	-1.4	-0.9	+0.3
アスパラギン酸	+0.3	-0.4	0	-2.2

すなわち、始めの1時間で、 $3.3 \mu\text{M/g}$ の減少、次の1時間では $2.4 \mu\text{M/g}$ の減少と、何れも可成りの減少を示しているが、3時間目、4時間目の1時間では、 $0.5 \mu\text{M/g}$ 、 $1.1 \mu\text{M/g}$ の減少であつて、何れも認むべき変化はない様である。

次に、グルタミンであるが、1時間値、 $3.4 \mu\text{M/g}$ 、2時間値、 $2.3 \mu\text{M/g}$ 、3時間値、 $1.4 \mu\text{M/g}$ 、4時間値、 $3.3 \mu\text{M/g}$ を示し、単位時間毎の減少は、第8表に示すように、それぞれ、 $2.8 \mu\text{M/g}$ 、 $1.1 \mu\text{M/g}$ 、 $0.9 \mu\text{M/g}$ 、の減少を、最後の4時間目迄の1時間では却つて $1.9 \mu\text{M/g}$ の増加を示していた。つまり、グルタミン酸と同じく、最初の1時間の減少

が最も著明であつた。

γ アミノ酪酸値は、第6表に示すように、incubate 前、 $3.1 \mu\text{M/g}$ 、1時間値、 $4.3 \mu\text{M/g}$ 、2時間値、 $2.9 \mu\text{M/g}$ 、3時間値、 $2.0 \mu\text{M/g}$ 、4時間値 $2.3 \mu\text{M/g}$ で、単位時間の変動は、第8表に示すように、最初、 $1.2 \mu\text{M/g}$ の増加、次、 $1.4 \mu\text{M/g}$ の減少、あとは見る可き変化がなかつた。

アスパラギン酸は、作用前、 $3.5 \mu\text{M/g}$ 、1時間値、 $3.8 \mu\text{M/g}$ 、2時間値、 $3.1 \mu\text{M/g}$ 、3時間値 $3.1 \mu\text{M/g}$ 、4時間値、 $0.9 \mu\text{M/g}$ であつて、第7表、第8表によつても判る様に、4時間目に至つて、 $2.2 \mu\text{M/g}$ の減少がみられる外には、認む可き変化はないようであつた。

考 案

先づ、先述のデーターについて考察を加えて見よう。液体窒素内に投入したものの、アンモニア量、平均、 $1.05 \text{ mg}\%$ と云うのは、Richter and Dawson²⁾ の $0.28 \text{ mg}\%$ 、塚田の $0.39 \mu\text{M/g}$ と云う値に比べると多量であるが、Richter and Dawson の実験は、体重 $35\sim 40 \text{ g}$ の大黒鼠を用いて測定したものであり、且つ、脳髄内に存するグルタミンより由来するであろうアンモニア値を引き去つた値であり、塚田の実験もまた、体重 70 g 程度のものを用いて得られた値の様である。私は実験に際し、体重 $100\sim 200 \text{ g}$ のものを用いた。これは後に述べる様に、ドライアイスアセトン法を用いるにしても、或は、色々の処置を加えるにしても便利であるからである。従つて、この体重の差が、値の不一致を来したのであるかも知れない。体重が大きいと、液体窒素内にて凍結するにより長い時間を要するからである。私の行つたものでは、体重、 $100\sim 200 \text{ g}$ で、脳髄内部迄完全凍結するのに、20秒以上も要する様であつた。この外、今迄の研究者によつて得られているデーターを挙げると、Riebeling³²⁾ の $1.0 \text{ mg}\%$ 、Bülow and Hohmes⁴⁾ の $2.2 \text{ mg}\%$ 、Krebs⁵⁾ の $6.0 \text{ mg}\%$ 等がある。

アミノ酸では、グルタミン酸の、140.9 mg%と云うのは Waelsch²⁸⁾ の 140~160 mg% の範囲内であるし、Tallan et al.³³⁾ の云う 128 mg%と比較しても大差なく、グルタミンも、92.3 mg%であつて、Waelsch²⁸⁾ の 44~84 mg%、Richter and Dawson²⁾ の 79 mg%と比較しても大差ない。γアミノ酪酸は、27.7 mg%で Roberts²⁶⁾ の 55 mg%に比すると少く、Tallan et al.³³⁾ の 23.4 mg%に比すると、略々一致すると云う具合で、これは先づ、大した違いはない様である。

次に、開頭、脳摘出と同時にドライアイスアセトン冷剤にて凍結させたものについてのアンモニア値であるが、7例平均は、0.64 mg%で、却つて液体室素内に投入した場合よりも少量であつた。この値は、ほぼ、塚田の示した 0.39 μM/g に近い。アミノ酸では、前法に比して、グルタミンは 94.6 mg%ではば一致するが、グルタミン酸、159.9 mg%、γアミノ酪酸 37.2 mg%は、前法に比すると、多量を示していた。

次に、脳スライスを用いての実験であるが、これには、Weil-Malherbe¹¹⁾、塚田等の代表的な研究がある。塚田は、この研究によりアンモニアの母体についての考察を行つている。先づ、脳アンモニアの母体は Adenyl 酸であろうとする Riebeling 等の説に対しては、この物質は、脳においては、たかだか 3 mg%にすぎず、とても、すべてのアンモニア源とは見做し難いと反対し、これよりはむしろ、脳に多量に存するグルタミン酸の酸化的脱アミノによるものであらうとしている。すなわち、脳スライスの endogenous respiration は高く、この際のアンモニアの産生は非常に旺盛であり、酸素消費の約60%が、グルタミン酸の酸化によつて説明出来る事、これに糖を基質として加えると、グルタミン酸の減少も、アンモニアの増加も、共に著明でなくなる事実を有力な証拠としてあげている。私の実験においても、第8表に示す如く、最初の1時間におけるアンモニアの増加は、グルタミン酸、グルタミンの減少でよく説明出来る

様である。次の2時間目迄の1時間のアンモニア増加も、同じくアミノ酸の減少から説明出来る様であるが、2時間目から、3時間目に至るアンモニアの増加は、如何にしても、これでは説明されぬ。つまり、最初の2時間目迄のアンモニア増加は、グルタミン酸系の減少から説明出来るが、それ以後、発生するアンモニアの母体は、また別に考えねばならぬ。Weil-Malherbe も脳スライスを用いて実験を行い、ammonia formation は30分から2時間の間が最も多く、4時間に及び、アンモニア増加の形はS字状になるとをのべ、アンモニア発生に二つの component、一つは、autolytic なもの、一つは細胞又はその要素に関連したものであると云つている。が、ともかく、この問題は、未だ解決されて居らず、今後の研究に俟つ所が大きい。私は更に、精神医学と関係の深い種々の処置により、アンモニア、並にアミノ酸が、如何に変動するかを追求してゆきたいと考えている。

総 括

1. 正常大黒鼠を液体室素内に投入した脳では、アンモニアは、1.05 mg%、グルタミン酸、140.9 mg%、グルタミン、92.3 mg%、γアミノ酪酸、27.7 mg%であつた。
2. 開頭、脳摘出、ドライアイスアセトン冷剤で凍結させたものでは、アンモニア値、0.64 mg%、グルタミン酸、159.9 mg%、グルタミン、94.6 mg%、γアミノ酪酸、37.2 mg%であつた。
3. 脳切片のアンモニア産生量は、最初の1時間で、5.1 μM/g、2時間で、7.3 μM/g、3時間で、13.8 μM/g 等々であつた。この際のグルタミン酸、グルタミンの減少は、最初の2時間迄は、ほぼ、アンモニアの増加に平行している。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました奥村教授に謹んで感謝の意を捧げます。

参 考 文 献

- 1) 田代: *Am. J. Physiol.* **60**, 519, 1922.
- 2) Richter, D. and Dawson, R. M. C.: *J. biol. Chem.* **176**, 1199, 1948.
- 3) Geiger, A. et al.: *Science*, **118**, 655, 1953.
- 4) Bülow, M. and Hohmes, E. G.: *Biochem. Z.* **245**, 459, 1932.
- 5) Krebs, H. A. et al.: *Biochem. Z.* **44**, 159, 1949.
- 6) Krebs, H. A.: *Biochem. J.* **29**, 1951, 1935.
- 7) Winterstein, H.: *Naturwissenschaft*, **21**, 22, 1933.
- 8) Weil-Malherbe, H.: *Biochem. J.* **30**, 665, 1936.
- 9) Weil-Malherbe, H.: *Biochem. J.* **32**, 2257, 1938.
- 10) Weil-Malherbe, H.: *Biochem. Soc. Symp.* **8**, 16, 1952.
- 11) Weil-Malherbe, H.: *Biochem. J.* **61**, 210, 1955.
- 12) Dickens, F. and Greville, C. D.: *Biochem. J.* **29**, 1468, 1935.
- 13) Conway, E. J.: 微量拡散分析法及び誤差論 (石坂音治訳)
- 14) Conway, E. J.: *Biochem. J.* **29**, 2221, 1935.
- 15) Conway, E. J.: *Biochem. J.* **29**, 2758, 1935.
- 16) Conway, E. J.: *Biochem. J.* **33**, 457, 1939.
- 17) 塚田, 高垣: *科学*, **23**, 12, 629, 1953.
- 18) 塚田: *生化学*, **25**, 1, 39, 昭28.
- 19) 塚田: *生体の化学*, **5**, 3, 107, 1953.
- 20) 塚田: *酵素化学シンポジウム*, **10**, 165, 1954.
- 21) 高垣, 平野, 杉本, 塚田: *酵素化学シンポジウム*, **11**, 1, 1955.
- 22) Tukata, Y. and Takagaki, G.: *Nature*, **173**, 1138, 1954.
- 23) Nachmansohn, D.: *J. biol. Chem.* **150**, 485, 1943.
- 24) Awapara et al.: *J. biol. Chem.* **187**, 35, 1950.
- 25) Wingo, W. J. and Awapara, J.: *J. biol. Chem.* **187**, 267, 1950.
- 26) Roberts, E. and Frankel, S.: *J. biol. Chem.* **187**, 55, 1950.
- 27) Roberts, E. and Frankel, S.: *J. biol. Chem.* **188**, 789, 1951.
- 28) Waelsch, H.: *Adv. in Protein Chem.* **VI**, 301, 1951.
- 29) 桑田: *クロマトグラフィー*, 昭27.
- 30) 佐竹: *クロマトグラフィー*, 昭27.
- 31) 化学の領域・クロマトグラフィー特集, **5**.
- 32) Riebeling, C.: *Z. schr. für Neurol. u. Psychiat.* **157**, 418, 1937.
- 33) Tallan, H. H. et al.: *J. biol. Chem.* **211**, 927, 1654.

Nitrogen Metabolism of the Brain

Part 2

The Ammonia and Amino Acid Contents of the Normal Rat Brain

By

Kiyoshi Kawai

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

Ammonia of the normal rat brain was measured by Conway's microdiffusion method, and amino acid by the paper chromatography, and the following data have been obtained in respective measurements.

1) In the case of the normal rat brain immersed in liquid nitrogen, the percentage of the contents of the following substances proved to be as follows: ammonia, 1.05 mg. per

cent; glutamic acid, 140.9 mg. per cent; glutamine, 92.3 mg. per cent; and γ aminobutylic acid, 27.7 mg. per cent.

2) Trepanation and Enucleation of the Brain. Contents of the substances found in the brain frozen solid by dry ice acetone gave the following percentage; ammonia, 0.64 mg. per cent; glutamic acid, 159.9 mg. per cent; glutamine, 94.6 mg. per cent; and γ aminobutylic acid, 37.2 mg. per cent.

3) The amounts of ammonia formed by brain slices were found to be $5.1 \mu \text{M/g.}$ for the first one hour, and $7.3 \mu \text{M/g.}$ in two hours; and $13.8 \mu \text{M/g.}$ in three hours, respectively. In this case, the decrease in the contents of glutamic acid and glutamine during the first two hours paralleled the increase in the contents of ammonia.
