

日本生理學雜誌

JOURNAL OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

原 著

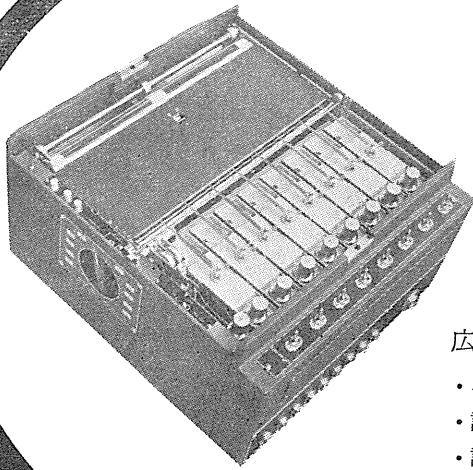
- 早川 秀雄：条件反射による脳内アンモニア及びグルタミン代謝の研究……………245
久米井 和夫： γ -Amino酪酸誘導体の哺乳動物回腸に対する作用……………252
新井 文一：グアニジン酸類の回腸，血圧，大脳皮質誘起電位に対する作用に就いて……………261
高橋 久仁男：ヒキガエルの肺筋緊張に及ぼす塩類ならびに滲透圧の変化の影響……………270
清水 英子：肝細胞リボ核蛋白粒子 (Ribosome) およびそのリボ核酸成分の電子顕微鏡的
研究 (第1報) 肝細胞リボ核蛋白粒子の電子顕微鏡的研究……………279
清水 英子：肝細胞リボ核蛋白粒子 (Ribosome) およびそのリボ核酸成分の電子顕微鏡的
研究 (第2報) リボ核酸成分の電子顕微鏡的研究……………285
藤 本 守：酸性尿生成機転に関する研究……………293

Originals

- HAYAKAWA-Hideo: Studies on metabolism of ammonia and glutamine in rat brain
accompanied with conditioned reflex……………245
KUMEI-Kazuo: Effect of derivatives of γ -aminobutyric acid on the mammalian ileum……………252
ARAI-Bunichi: Effect of some guanidino-derivatives on the isolated ileum, blood pressure
and cortical evoked potential of the mammals……………261
TAKAHASHI-Kunio: Effect of change in salt concentration and in osmotic pressure of the
surrounding fluid upon the muscle tone of the isolated toad lung……………270
SHIMIZU-Hideko: Electron microscopic observation of the ribonucleoprotein particles
(ribosomes) isolated from liver cell and of their RNA component. I. An
electron microscopic study on the ribonucleoprotein particles of liver cell……………275
SHIMIZU-Hideko: Electron microscopic observation of the ribonucleoprotein particles
(ribosomes) isolated from liver cell and of their RNA component. II. An
electron microscopic study on the RNA component of the ribonucleoprotein
particles……………285
FUJIMOTO-Mamoru: Study on mechanism of acid production of urine in acidotic dog……………293

日 本 生 理 学 会

Physiological Society of Japan



インク書き オシログラフ

IR-201型

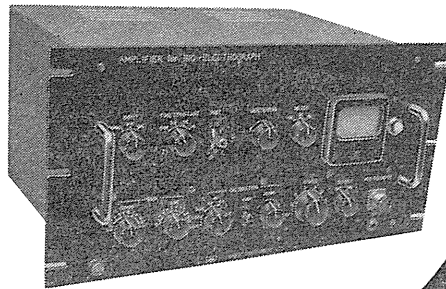
広汎な用途、安定な動作

- エレメント数 2, 4, 6, 8
- 記録ペンの最大振巾 $\pm 20\text{mm}$ $\pm 25\text{mm}$
- 記録速度の電氣的切換 1, 2, 5, 10, 25, 50
125, 250mm/sec
- 電 源 AC100V, 50又は60c/s

生体電気現象測定用 増巾器

EB-101-Y

これは EEG, ECG, EMG
はもとより、適当なトラン
スジューサーを用いれば皮
膚電気反射, 呼吸曲線, 指
尖脈波等も測定できるポリ
グラフ用
の増巾器
です。
ラックパネ
ル式構造で、
インク書きオ
シログラフ、
ブラウン管オ
シロスコープ等と
組合せて生体電気現
象の記録ができます。



san,ei sokki

従来の三栄測器株式会社は販
売部門, 電子管装置製造部門,
記録器製造部門の三つに分れ、
4月1日より新発足すること
になりました。

販 売

三栄測器商行株式会社

東京都新宿区柏木 1-95 TEL (371) 7117-8・8114-5

電子管装置
製造
記録器
製造

三栄測器株式会社

三栄レコーダー製造株式会社

条件反射による脳内アンモニア及びグルタミン

代謝の研究 612.833.81:612.825:612.015.3

Studies on metabolism of ammonia and glutamine in rat
brain accompanied with conditioned reflex

早川 秀雄 (HAYAKAWA-Hideo)*

The changes of the content of ammonia, glutamine and several amino-acids in brain induced by electric or conditioned stimulus were tested. Also the effects of administration of neurotropic drugs such as convulsive or monoamine-oxidase inhibitor were studied. The results obtained were as follows;

1) An increase of ammonia in brain was not observed by application of electric shock for 1 sec. But a significant increase of ammonia was obtained on 4 sec. after 1 sec. stimulation.

2) The rise of ammonia content corresponded to the 5 sec. second electrical stimulation was observed on 60 min. after the first stimulation for 1 sec., but not on 60 min. after the first 5 sec. stimulation.

3) The time interval required for recovery to the resting value of brain ammonia after the stimulation was 60 sec. On the control group, 30 sec. On the unavoidable conditioned group and 10 sec. On the avoidable.

4) In the case of the avoidable conditioned group, the second electrical stimulation was already effective on 30 minutes after the first stimulation for a rise of brain ammonia.

5) The contents of glutamic acid, aspartic acid, γ -aminobutyric acid and N-acetylaspartic acid in rat brain was not changed significantly by the application of electric or conditioned stimulus and by the administration of convulsive, iproniazide or reserpine.

1. 緒 言

脳内遊離アンモニア値は脳の機能水準を示す有力な生化学的指標であることは、種々報告のある所である¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。即ち痙攣、昏睡、四肢からの通電刺激等によって脳内アンモニアが増加し、麻酔時には減少することが知られている。然し動物の死後にも脳内に爆発的なアンモニア増加がみられるのであって、脳内アンモニアの生理的変動を追究する為には、死後変化を出来るだけ除き得る、液体窒素等の使用による急速固定法を用いることが、必要欠くべからざる条件となる⁴⁾。又、一方 *in vitro* で脳切片を葡萄糖を含まない Ringer 中で好氣的に incubate すると旺盛なアンモニア形成がみられ、葡萄糖やグルタミン酸を添加することにより、遊離アン

モニアの増加は見られなくなる⁵⁾⁶⁾。

このように遊離アンモニアは脳組織代謝に於いて、特異的な役割をはたすことが注目されているのである。一方、脳内に於けるアンモニアの解毒機構として、グルタミン合成系が強く脳に存在していること⁷⁾、及びグルタミン酸の代謝系も又アンモニアの代謝と密接に関連していること等⁸⁾、脳の機能生化学の研究の上で、脳内アンモニア、グルタミン量の変化は重要な課題となっている。

そこで著者は白鼠を用いて、脳の機能状態を出来るだけ詳細に統制しながら、脳内の不安定物質の変動を追究したのである。即ち、白鼠の四肢からの通電刺激や薬物投与を行って、脳内アンモニア、グルタミン、及び諸種アミノ酸の変動を検討すると共に、条件反射を形成した動物について、条件反射形成過程に於ける物質代謝系の変化をも、併せ検討したのでここに報告する。

* 東邦大学医学部第2生理学教室(塚田裕三教授)
2nd Dept. of Physiol., Toho Univ. School of Med.
〔昭和36年1月21日受付〕

II. 実験方法

実験装置：動物の条件反射の形成，刺激並に凍結固定は，図1に示す装置で行った．装置は外部からの刺激を遮断し得る暗，静室に設置した．

電気刺激を与えるための，銀線網を備えた床(A)は電磁石(B)で落下しないよう三点を支持し，動物を固定する際は電磁石の電源を切断し，床上にある動物共，液体窒素を蓄えた液槽(D)中に落下せしめ，動物を急速に凍結固定した．(C)は60W電球で，条件反射形成の為の条件刺激として使用した．

1図の右側に示したものは，逃避条件反射の為の実験装置で，左側の装置2コを合せ，その間に自由に開閉する扉を設けて左右を遮断してある．電気刺激，条件刺激は交互に与える様にした．

実験動物：実験には同腹又は同系統の白鼠の雄のみを使用し，体重は60-80gのものである．実験前10日間に亘って，同一条件下に体重を測定しながら飼育した後，実験に供した．

防禦条件反射の形成は左側の装置で，逃避条件反射の形成には右側の装置を用いた．光を条件刺激とし，床上銀線網より40-50Vの交流電気刺激を四肢より与え，これを無条件刺激として，1日5回施行で10-14日間に亘って条件強化を行った．対照群についても無工作下に同一条件で飼育した．

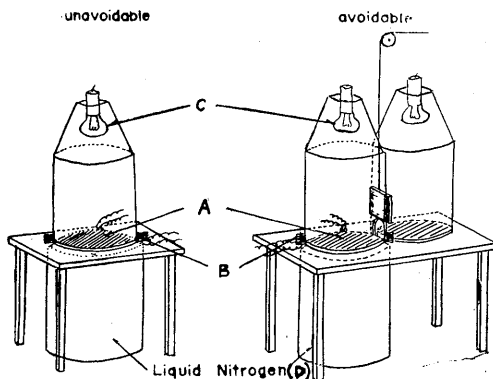


Fig. 1. Apparatus for experiment.

条件刺激の与え方については，各項につき後述する．

実験方法：白鼠を実験装置に入れ30-60分静置し全く詮索反射の見られなくなった実験動物を，種々の条件下で液体，窒素中に落下させ，急速に凍結固定せしめた後脳組織を取り出し凍結下に細末として，10%トリクロール酢酸中で固定し，組織量を秤量後遠心分離して除蛋白し，アンモニア，及びグルタミンの抽出を行った．

薬物の投与に当っては，Fluoroacetate (以下F. A. と略す)は30 mg/kgを腹腔内に，Cardiazolは300 mg/kgを，イプロナイヤジッド(カトロン中外)は10 mg/kgをそれぞれ皮下に，Reserpineは10 mg/kgを腹腔内に注射した．

アンモニアの定量は脳抽出液についてConwayの微量拡散法⁹⁾に従って行い，グルタミンの定量は，アンモニア定量に使用した同一資料につき，Harrisの方法¹⁰⁾に従って行った．

アンモニア及びグルタミン値は，実験操作中の分解量をRichter等の成績から補正¹⁾して算出した．

アミノ酸の定量は，冷凍細末組織を75%エタノール中で除蛋白し，塚田等の方法¹¹⁾に従い，ペーパークロマトグラフィーにより分離した後，各スポットをニンヒドリンにより発色し比色定量した．

III. 実験成績

1) 通電刺激及び痙攣剤投与の効果

詮索反射のなくなった白鼠に四肢より5秒間の通電刺激を与えると，第1表に示す如く脳内アンモニアは $0.41 \mu\text{M/g}$ の値を示し，安静時の値 $0.32 \mu\text{M/g}$ に比し明らかに有意の上昇を示す．此の通電刺激による脳内アンモニアの増加は，既に報告されている⁴⁾．通電刺激を1秒間のみ与えた場合には，脳内アンモニアは増加しないが，刺激を中止してから更に4秒経過した後の脳内アンモニアは， $0.39 \mu\text{M/g}$ の値を示し有意の増加が認められた．

之等の条件では、グルタミン量は変化は認められなかった。

白鼠にカルジアゾール (300 mg/kg 皮下) を注射すると3-5分で全身痙攣を起してくるが、この痙攣発作時にもアンモニアの増加が認められ、Richter¹⁾等によるピクロトキシンの成績と一致する。

フルオロ酢酸は 30 mg/kg の投与量では、約50分で白鼠に全身痙攣をひき起す。そこで、F. A. 注射後20分の前痙攣期と50分後の全身痙攣時とについて、脳内アンモニア及びグルタミンの値の測定を行ってみると、第1表の如く既に前痙攣期にアンモニアは高い値を示した。即ち痙攣時に 0.66 μ M/g 前痙攣時に 0.65 μ M/g であり、グルタミンには著変が見られなかった。先に Benitez 等³⁾ は、犬について同様の実験を行い、犬でも前痙攣期に既にアンモニアが増加していることを報告している。

モノアミノオキシダーゼの強力な阻害剤として知られ¹²⁾¹³⁾、その臨床応用も試みられているイプロナイヤジッド (カトロン中外) を 10 mg/kg 注射し、40時間後に脳内アンモニア、グルタミンを測定してみると、脳内アミノオキシダーゼは強力に阻害されていると考えられる状態でも、全く安静時のものとの間に変化が見られなかった。又カトロン注射後、通電刺激や条件刺激による脳内アンモニアの変動を観察したが、無処置群との間に差異は認められなかった。

2) 刺激強度と残存効果

一度与えられた通電刺激はその後も脳内に長期に亘って残存効果をもたらすことが、塚田等によって見出されている⁴⁾。著者は先づ初回刺激の強弱が残存効果に与える影響を検討してみた。

既に前述した如く、1秒間刺激でも4秒後には脳内アンモニアの増加を来すことを認めたので、この様な短時間の刺激による残存効果を試みると、1秒間の刺激を与えた後30分では、第2回目の5秒間刺激に対応するアンモニア増加は認められないが、60分、90分後には第2刺激によって、明らかに脳内アンモニア増加を示

Table 1.
Effects of Electrical Stimulation and Convulsive Drugs on Ammonia and Glutamine Contents of Rat Brain.

Condition	No. of Exp.	Ammonia (μ mole/g \pm S.D.)	Glutamine (μ mole/g \pm S.D.)
Resting	14	0.32 \pm 0.02	3.58 \pm 0.55
5 sec Elect. Stim.	6	0.41 \pm 0.03*	3.60 \pm 0.57
1 sec Elect. Stim.	4	0.30 \pm 0.08	3.84 \pm 0.44
4 sec after 1 sec Elect. Stim.	4	0.39 \pm 0.03*	3.26 \pm 0.27
Cardiazol (Convulsive State)	8	0.84 \pm 0.27	3.31 \pm 0.58
Fluoroacetate (Convulsive State)	4	0.66 \pm 0.14	3.69 \pm 0.42
Fluoroacetate (Preconvulsive State) [‡]	4	0.65 \pm 0.11	3.74 \pm 0.27

* P<0.01.

‡ 20 minutes after administration of drug.

Table 2.
Effects of the Second Electrical Stimulation (5 sec) on Ammonia and Glutamine Contents of Rat Brain.

Time after First Elect. Stim.	No. of Exp.	Ammonia (μ mole/g \pm S.D.)	Glutamine (μ mole/g \pm S.D.)
30 min. after 1 sec Stimulus	4	0.31 \pm 0.02	3.74 \pm 0.46
60 min. after 1 sec Stimulus	2	0.42	4.08
90 min. after 1 sec Stimulus	2	0.56	3.30
60 min. after 5 sec Stimulus	2	0.32	4.29
Resting	14	0.32 \pm 0.02	3.58 \pm 0.55

した。然し、5秒間の刺激を最初に与えた後では、60分後でも第2刺激に應ずるアンモニア増加は認められなかった (第2表)。

3) 条件反射形成と脳内アンモニア及びグルタミンの代謝

白鼠に逃避条件反射、防禦条件反射 (逃避不能) を形成したものと、無処置の対照群にたいし、5秒間の通電刺激、或は条件刺激 (光) を与えた後の脳内アンモニア及びグルタミンの継時的消長について検討した。

防禦条件反射とは、図1の左側装置によって、条件刺激 (光) と無条件刺激 (5秒通電) を併用して、1日5回10日間に亘って施行し、条件強化を行ったものであり、逃避不能の状態では条件刺激のみにより、不穩の動作乃至は悲鳴

Table 3.

Comparison of After-Effect of 5 sec Stimulus[⊕] on Ammonia and Glutamine Contents of Brain among Three Experimental Groups.

Time after First Stim.	Group	Control Group	Unavoidable	Avoidable
0 sec	Ammonia	0.41±0.03* (6)	0.40±0.05* (6)	0.39±0.01* (7)
	Glutamine	3.66±0.57	3.67±0.57 (6)	3.43±0.39
5 sec	Ammonia	0.37±0.04* (4)	0.38±0.04* (4)	0.33±0.07 (6)
	Glutamine	3.55±0.45 (4)	3.85±0.47 (4)	3.93±0.33 (6)
10 sec	Ammonia	0.40±0.03* (4)	0.39±0.02* (4)	0.33±0.01 (4)
	Glutamine	3.46±0.18 (4)	4.21±0.42 (4)	3.95±0.46 (4)
15 sec	Ammonia	0.35±0.02** (4)	0.30±0.02 (3)	0.32±0.03 (5)
	Glutamine	3.63±0.27 (4)	4.00±0.11 (3)	3.66±0.41 (5)
60 sec	Ammonia	0.32±0.01 (4)	—	—
	Glutamine	3.16±0.47 (4)	—	—

‡ The contents of ammonia and glutamine were shown by $\mu\text{mole/g}\pm\text{S.D.}$

‡‡ Number in parentheses was number of experiments.

⊕ Electric shock was applied to the control group for 5 sec., and conditioned stimuli (light) for 5 sec. were applied to the conditioned groups.

* $P<0.01$ (Statistical treatment has been done as compared with the resting value.)

** $0.01<P<0.02$ (with the resting value.)

Table 4.

Effects of the Second 5 sec Electrical Stimulation on Ammonia and Glutamine in Rat Brain established by Avoiding Conditioned Reflex.

Time after First Conditioned Stim.	No. of Exp	Ammonia ($\mu\text{mole/g}\pm\text{S.D.}$)	Glutamine ($\mu\text{mole/gS.D.}$)
10 min.	4	0.29±0.03	3.52±0.18
30 min.	7	0.38±0.04*	3.29±0.40
60 min.	3	0.40±0.02*	3.34±0.36

* $P<0.01$ (Statistical treatment has been done as compared with the resting value.)

Table 5. Amino Acid Content of Rat Brain under Various Conditions.

Condition	GABA	Asp.	Glu.	NAA
Resting	2.87±0.53 (3)	4.63±0.37 (3)	11.1±0.86 (3)	5.05 (2)
Cardiazol (Convul. State)	2.01±0.17 (3)	4.08±0.24 (3)	9.64±0.94 (3)	3.70 (2)
Fluoroacetate (Preconvul. State)	1.83 (2)	3.21 (2)	8.38 (2)	3.89 (2)
Catron* (Resting State)	2.65±0.40 (3)	4.50±0.45 (3)	8.96±1.13 (3)	3.85±0.30 (3)
Catron* (5 sec Elect. Stim.)	2.49±0.56 (3)	4.58±0.78 (3)	11.3±4.17 (3)	4.83 (2)
Reserpine**	1.89 (2)	4.90 (2)	10.2 (2)	—
Reserpine plus Catron	2.17±0.27 (3)	4.45±0.40 (3)	10.9±0.13 (3)	—

‡ The contents of each amino acids, γ -aminobutyric acid (GABA), aspartic acid (Asp.), glutamic acid (Glu.) and N-acetylaspartic acid (NAA) were shown by $\mu\text{mole/g}\pm\text{S.D.}$. The content of these amino acids in the case of catron* injection were measured 48 hours after the application of 10 mg/kg-Catron (Chugai Seiyaku) and in the case of Reserpine** injection 3 hours after the application of 6 mg/kg-Reserpine.

‡‡ Number in parentheses was number of experiments.

を呈するに至ったものである。

逃避条件反射は、図1の右側装置を使用して強化工作を行った。即ち条件刺激(光)、及び無条件刺激の併用、強化回数、期間については前者と同様であるが、刺激に伴って左右を境する扉が開き、電激を与えられた部屋より無刺激の部屋へ逃避する様、反復強化を行った。

対照群は無工作下に他の群と同一条件で飼育したものである。

之等3群に5秒間の刺激(条件反射形成群には条件刺激、対照群には電気刺激を与えた)を与えると、共に有意のアンモニア増加が見られた。刺激中断後60秒で対照群では安静時のアンモニア値に復するが、防禦条件反射群では30秒で、逃避条件反射群では更に早く安静時の値に復するのが見られ、5秒後には既に刺激により増加したアンモニア値は減少の傾向を見せ、10秒では全く安静時の値に復した(第3表)。

第4表は、5秒間の条件刺激を与えた後、一定時間静置し、更に第2回目の5秒間通電刺激を与えた際に起る脳内アンモニア、およびグルタミン値の変化を逃避条件反射群について検討したものである。

初回の刺激後10分静置し、更に2回目の刺激を与えても、アンモニアの増加はみられなかったが、30分後、及び60分後では既に有意の増加がみられた。一方グルタミン値には著変がなかった。塚田等⁴⁾は対照群並びに

防禦条件反射群に対する第2回の刺激の影響について報告しているが、対照群では、初回刺激後150分で初めて第2の刺激に対応して、有意のアンモニア増加のあることを認めており、防禦条件反射群では、その時間間隔が60分に短縮されることを示した。著者の行った逃避条件反射群では、又更にその時間間隔の短縮が認められたのである。

4) 脳内アミノ酸 (グルタミン酸, アスパラギン酸, γ -アミノ酪酸, N-アセチルアスパラギン酸) の検討;(第5表).

前述の如き種々なる条件下に於ける、脳内アミノ酸の変化を比較検討してみると、通電刺激、カトロン及びレセルピン注射、カルデアゾール痙攣の場合には、脳内特異アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸、N-アセチルアスパラギン酸には有意の変動は認められなかった。

F. A. 注射により比較的長期に亘る潜時を経て、痙攣を発動する様な場合は全般に亘ってアミノ酸の低下の傾向が見られるが、一般症状の悪化による2次的な変化も充分考慮されねばならない。

IV. 考 察

既に Richter, Dowson 等により指摘せられている如く脳内アンモニア量が、麻酔或は興奮機制にともなって変動することが明かとなり、脳機能水準とアンモニア代謝の間に密接な関係があることは疑いない所である。然し脳組織のアンモニアがグルタミン酸より由来するものか、或はその他の物質に由来するものか、種々議論のある所であるが¹⁴⁾¹⁵⁾、アンモニアの処理機構としてグルタミン酸からグルタミン合成への道すがら、重要な役割をはたしていることは一般に認められている⁸⁾。強度な興奮の典型と見做されている痙攣時にもアンモニアの増加が見られ、F. A. の場合の如く前痙攣期に既にアンモニアは高値を示しているのである。この事実は Benitez³⁾ 等が犬で行った実験とよく一致しており、アンモニア増加が痙攣の結果と云う

よりも痙攣準備状態ですでにアンモニア代謝系が変化していると見做すことが出来る。然し酸素欠乏時にも脳内アンモニアの増加の認められることから、アンモニアの増加が痙攣そのものによるか、痙攣によって惹起せられる酸素欠乏状態を考慮すべきかは尙検討の余地がある。

塚田等は痙攣を伴わない四肢からの通電刺激による防禦反射を用い、更には条件反射を形成することにより脳の機能水準の変化をより詳細に検討し、興奮、制止に対応した物質変化をアンモニア、グルタミン量の変動から追求してきている¹⁶⁾。

1秒間のみの通電刺激によっては、脳内アンモニアの増加は認められないのであるが、その後4秒経過してアンモニア値の増加が認められたことは1秒間刺激が既に脳内アンモニア生成をうながすのに十分な刺激効果をもつことを示している。ただアンモニア値の増加として捉える為には若干の時間経過を必要とするものであると解される。先に塚田⁴⁾等は、5秒間通電刺激を与え脳内アンモニアの増加を認めた時、即ち刺激がアンモニア発生系に有効に影響を与えた際には、その後150分に亘って第2の5秒間通電刺激に対応するアンモニア増加は認められぬことを報告しているが、1秒間刺激後30分迄は第2の通電刺激が無効であり、60分後にすでに第2の刺激が有効になる事実は、刺激時間がたとえ1秒間でも、その刺激はアンモニア代謝系に対し有効に働いていること、及び1秒刺激は5秒刺激より脳内代謝に与える影響が少いことを示唆している。

アンモニアイオンは脳に対して有毒なものであることは周知の事であり、通常血中アンモニア量はほぼ零と考えられている。

脳内に於けるアンモニアの解毒機構はグルタミン酸のアミド形成によるグルタミン合成によって営まれていることは、Elliott⁷⁾ 等により酵素学的に確められている。又塚田等の長期刺激時、アンモニアの増加なしに脳内グルタミンの増加すること、或は NH_4Cl 投与によるグルタミン増加の事実からも生理的条件下でも同様の

機構が働いているものと考えられる。従って脳組織では、アンモニア発生系とグルタミン合成系とが動的平衡を保持し見掛上の脳内アンモニア値を規定しているものと考えられる。そしてアンモニアの増加がグルタミン合成系を促進強化するものと見做されるのである。

次に刺激により増大したアンモニアの継時的推移をみると、条件反射を形成した群では対照群に比し、より早く安静時の値に復する。特に逃避条件反射群では、5秒後に既に減少の傾向が見られる。此のことは刺激により誘起されるアンモニアグルタミン系の変動が、逃避条件反射を形成した場合に最も早く終ることを考えさせる。又逃避条件反射群について、第2回の刺激に反応するまでの時期が他の群に比し最も早く、初回刺激後既に30分でほぼ完全に回復していることも、条件強化の方式によって脳内代謝に与える効果を異にしていることを示すものである。このことは又、同一の刺激が条件強化を行うことにより異った刺激の強度としてとらえられ、脳内アンモニア、グルタミン代謝に差異ある変化をもたらすものとも考えられる。

脳内のアミノ酸分布は他臓器と異なる様相を示すと共に、その代謝も又特殊な様式をとることは種々報告のあるところである¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。然し著者等の用いている通電刺激や、或は又薬物投与によっては、グルタミン酸、アスパラギン酸、 γ -アミノ酸、N-アセチルアスパラギン酸等脳に特異なアミノ酸量には有意の変化は見られず、アンモニア、グルタミンに比し機能的により安定な物質であると考えられる。ただF.A.の場合の如く比較的慢性に全身性の変化が起ると考えられる場合には、一般にアミノ酸が低値を示しているのである。このことは、インシュリン投与による昏睡期にグルタミン酸の低下²⁰⁾が見られることと同様の機構によるものとも考えられよう。

又カトロン、レセルピン等の投与が、条件刺激や無条件刺激によるアンモニアグルタミン代謝に全く影響を与えない事は、脳内のアミン代謝とアンモニア、アミノ酸代謝とが、それ程密

接に関連していないものと見做すことも出来るであろう。これらのことから、アンモニアグルタミン系の変動が、生理機能と関連して最も捉えやすい生化学的指標であることが明らかとなった。更に塚田等は *in vivo* に於けるアンモニアグルタミン代謝路の生化学的追究を、 N^{15} -アンモニアや C^{14} -化合物を用いて検討しつつある。

V. 結 論

白鼠の四肢よりの通電刺激や光を条件刺激とした時の、防禦条件反射、逃避条件反射の形成過程に於ける脳内アンモニア、グルタミン及びアミノ酸の変化を追究し、併せ痙攣剤、モノアミン酸化酵素阻害剤の効果についても検討し次の結果を得た。

1. 1秒通電刺激によっては脳内アンモニア値の変化は見られないが、その後4秒経過すれば、有意のアンモニア値の増加が認められる。
2. 1秒刺激を与えた後60分静置すれば、第2回目の5秒間通電刺激でアンモニアの増加が見られる。然し初回に5秒間の通電刺激を行えば、60分後でも尙第2刺激によるアンモニアの増加はみられない。
3. 刺激によって増加した脳内アンモニアは、対照群では刺激後60秒で安静時の値に復するが、防禦条件反射群では30秒で、逃避条件反射群では10秒後に、既に安静時の値に復する。
4. 逃避条件反射群では、初回刺激後30分経過すれば、第2回の通電刺激によるアンモニア増加が見られる。
5. 痙攣前、イプロナイヤジッド、レセルピンの投与及び条件刺激、通電刺激によっては、脳内グルタミン酸、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸、N-アセチルアスパラギン酸には有意の変化は認められない。

稿を終るに当り終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師塚田裕三教授に深甚なる謝意を表します。亦終始直接御指導御鞭撻賜った平野講師に深謝し尚併せて、御指導御援助賜った永田博士、松谷学士、植村学士に感謝致します。

文 献

- 1) Richter, D. and Dowson, R. M. C. (1948) The ammonia and glutamine content of the brain. *J. Biol. Chem.* **176**, 1199
- 2) Vladimirov, G. E. (1954) (青木陽子訳) 脳の機能生化学とパプロフの方法論 脳の化学の総括と展望 生物化学 **6**, 170
- 3) Benitez, D., Pscheidt, G. R. and Stone, W. E. (1954) Formation of ammonium ion in the cerebrum in fluoroacetate poisoning. *Am. J. Physiol.* **176**, 488
- 4) Y. Tsukada, G. Takagaki, S. Sugimoto, and S. Hirano (1958) Changes in the ammonia and gultamine content of the rat brain induced by electric shock. *J. Neurochem.* **2**, 295
- 5) Weil-Malherbe, H. and Green, R. H. (1955) Ammonia formation in brain (Studies on slices and suspensions). *Biochem. J.* **61**, 210
- 6) G. Takagaki, S. Hirano and Y. Tsukada (1957) Endogenous respiration and ammonia formation in brain slices. *Arch. Biochem. Biophys.* **68**, 196
- 7) Elliott, W. H. (1951) Studies on the enzymatic synthesis of glutamine. *Biochem. J.* **49**, 106
- 8) Weil-Malherde, H. (1950) Significance of glutamic acid for the metabolism of nervous Tissue. *Physiol. Rev.* **30**, 549
- 9) Conway, E. J. (1950) (石坂訳) 微量拡散分析及び誤差論 南江堂
- 10) Harris, M. M. (1943) Studies regarding glutamine-like substance in blood and spinal fluid, including method for its quantitative determination. *J. Clin. Invest.* **22**, 569
- 11) 塚田裕三・永田 豊 (1961) 脳内遊離アミノ酸のペーパークロマトグラフィーによる分離定量法の検討 生化学 **33**, (2号) (印刷中)
- 12) Zeller, E. A., Barsky, J. and Bermann, E. R. (1955) Amine oxydases XI inhibition of monoamine oxydase by 1-isonicotinyl-2-isopropylhydrazine. *J. Biol. Chem.* **214**, 267
- 13) 江副・加藤・二階堂 (1960) 肝, 脳, MAO 活性におよぼす JB-516, フェネルジンの影響 第3回神経化学懇話会発表 (大阪 昭和35)
- 14) Tsukada, Y. and Takagaki, G. (1954) Ammonia-formation system in brain tissue. *Nature*, **173**, 1138
- 15) Vrba, R. (1955) Significance of glutamic acid in metabolic process in the rat brain during physical exercise. *Nature*, **176**, 1258
- 16) 塚田裕三 (1958) 刺激と脳の代謝 神経化学 (中脩三編) 医学書院 東京 第2版 297頁
- 17) 浅野正夫 (1960) 大脳皮質切片に於けるアミノ酸代謝に関する研究 日本生理誌 **22**, 644
- 18) Edited by R. O. Brady, and D. B. Tower (1960) The neurochemistry of nucleotides and amino acids. John wiley & Sons, Inc. New york.
- 19) H. Naruse, M. Kato, M. Kurokawa, R. Haba and T. Yabe (1960) Metabolic defects in a convulsive strain of mouse. *J. Neurochem.* **5**, 359
- 20) Dawson, R. M. C. (1949) Effect of insulin hypoglycaemia on brain glutamate. *Nature*, **164**, 1097

γ -Amino 酪酸誘導体の哺乳動物回腸に対する作用 612.33:612.014.469

Effects of derivatives of γ -aminobutyric acid on the mammalian ileum

久米井和夫 (KUMEI-Kazuo)*

The author has observed the effect of GABA, its derivatives and their related compounds on the ileum of rats, guinea-pigs, rabbits and cats.

哺乳動物の脳内に存在する ω -アミノ酸である γ -Amino 酪酸の生物学的作用に就いては、当教室に於ても数年にわたり研究されて来た。併し、この一見極めて簡単な化学構造を示すアミノ酸の作用は、仲々複雑で、一言をもって結論できない状態である。そこで、高橋は γ -Amino 酪酸の誘導体をつくり、それらの物質の作用と化学構造の関係から、 γ -アミノ酪酸の作用様式を明らかにしようと試みた。本論文に発表する実験は、それら一連の実験中、著者の分担した回腸に対する作用様式に関するものである。

1. 実験方法

実験動物としては、大黒鼠、モルモット、家兎を使用した。大黒鼠、モルモットはウレタン又はエーテル麻酔下で、又家兎及び猫はエーテル麻酔下で、開腹し、回腸片を剔出した。

腸管の運動の観察には、大黒鼠、モルモットでは、約 5 cm の長さの回腸の運動を、家兎では約 1-2 cm 長の回腸の運動を郷原氏楨杆により Kymographion に記録した。縦走筋と輪状筋の運動を別々に観察するには、簡単に Job 等の方法¹⁾を用いた。

腸管は、60-100 cc の Tyrode 液中につるし、酸素を絶えず供給した。恒温槽の温度は、37-38°C に保った。

試験物質はあらかじめ適当な濃度の溶液を製しておいて、溶液に加えるか、時には結晶そのものを溶液に投入した。

使用した試験物質中、 γ -Amino 酪酸誘導体

は全て本研究のために合成したもので其の合成法及び化学的性状に就いては、池田脩²⁾の論文に述べられる。

A) γ -Amino 酪酸 (GABA) と他の ω -アミノ酸の作用

Hobbiger³⁾の報告しているように、モルモット回腸が最も敏感に GABA に反応した。即ち、モルモット回腸は 10^{-5} - 10^{-4} M の GABA に殆ど常に反応した。併し、反応様式は標本により異なり、大体 3 つの型に大別出来る。1) 一過性の著明な緊張増加に続いて軽度の持続的な弛緩の生ずる場合、2) 最初の緊張増加が不明で、著明な弛緩の生ずる場合、この緊張弛緩は GABA を作用させて置いても 3-4 分内に次第に弱まって行く傾向があった。3) 緊張増加のみを示す場合、持続的な場合もあったが、一過性の著明な緊張増加に続いて軽度な緊張増加が尾を引くと云う場合が多かった。この 3 つの型の内では、1) の型に生ずる場合が最も多かった。そして、1 つの標本に於ては、1 つの型の反応が生じ、決して他の型の反応に移行すると云うことはなかった (第 3 図, 第 5 図, 第 9 図参照)。

大黒鼠回腸の GABA に対する反応も、標本によりかなりの異同があった。ある例では、振子運動の振巾増大が著明で、それに緊張弛緩を伴った。又、ある例では、緊張増加のみが著明な場合もあった。中には、GABA に全然反応しない標本もあった (第 1 図)。

家兎回腸は、 10^{-8} M 以上の GABA に反応して、主として緊張増加が生じた。家兎回腸には GABA に反応しないものもあった。

猫回腸はモルモット回腸とほとんど同程度に

* 東京医科大学生理学教室
Dep. of Physiol., Tokyo Med. College

[昭和35年9月13日受付]

GABA に敏感に反応し、一過性の軽度の緊張増加とそれに続く弛緩が生じた(第7図参照).

一連の ω -アミノ酸中、グルタミンは全ての回腸に対して作用はなかった.

β -アラニンは、 10^{-6} - 10^{-5} M の低濃度で、大黒鼠回腸の振子運動の振幅増大を生じ、この振幅増大は濃度をますにつれて、著明となった。 β -アラニンの作用の特徴は、この振幅増大が週期的に群をなして生ずる点にある(第2図).

β -アラニンのモルモット回腸に対する作用は弱く、極めて軽度の緊張弛緩が時に認められるにすぎなかった.

家兎回腸も β -アラニンにより軽度の緊張弛緩を生じた.

δ -アミノ吉草酸(δ -Aminovaleric acid), ϵ -アミノカプロン酸(ϵ -Aminocaproic acid) は共に全ての回腸に対して作用がなかった.

B) GABA の N-置換体の作用

GABA のアミノ基の水素を Methyl 基で置換した N-methyl- γ -aminobutyric acid, N-dimethyl- γ -aminobutyric acid, N-trimethyl- γ -aminobutyric acid の作用をモルモット回腸に於て検討した.

GABA と methyl-置換体との作用は、GABA

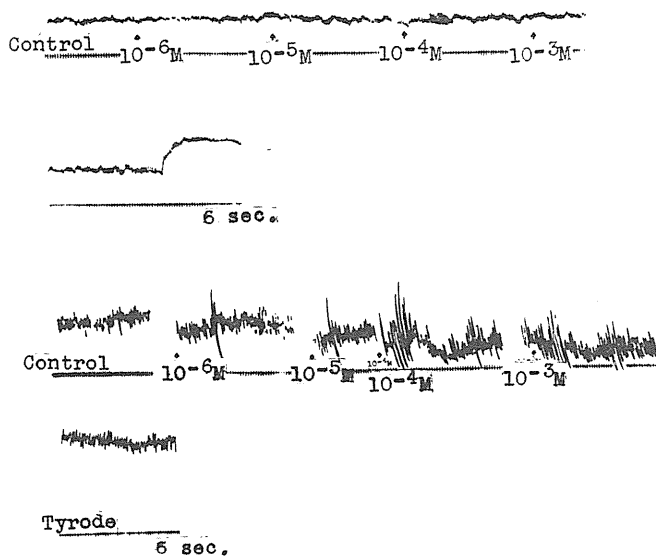


Fig. 1. Effect of GABA on an isolated rat's ileum.

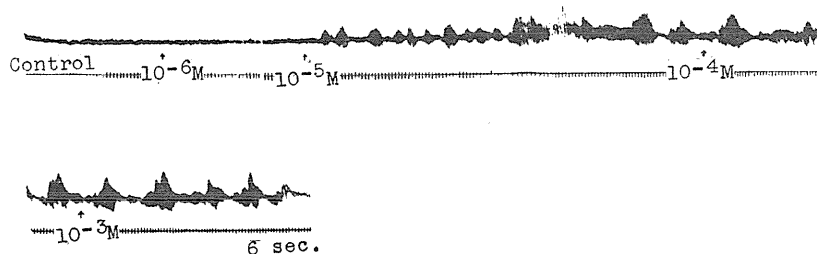


Fig. 2. Effect of β -alanine on a rat's ileum.

に対して緊張増加を示す標本に於ては、GABA < methyl-GABA < Dimethyl-GABA < Trimethyl-GABA であった.

併し、GABA に対して緊張弛緩を示す標本に於ては、GABA > Methyl-GABA > Phenyl-GABA > Dimethyl-GABA > Trimethyl-GABA の順であった(第3図参照).

又、GABA に対して一過性の緊張増加と軽度の弛緩を生ずる標本では、N-置換体の作用強度は標本で不同で明確な結論が出なかったが、弛緩を生ずる作用は GABA が最も強かった.

N の Phenyl 置換体 N-Phenyl-GABA は N-methyl-GABA に比し作用弱く N-acetyl-GABA は殆ど作用を示さなかった.

又、家兎回腸に於ても、GABA, N-methyl-GABA, N-dimethyl-GABA, N-trimethyl-

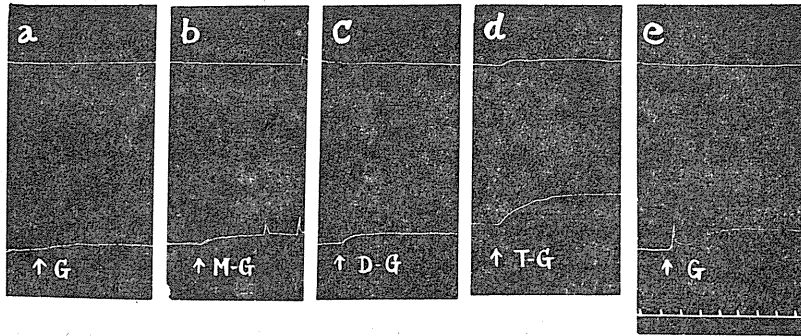


Fig. 3, A.

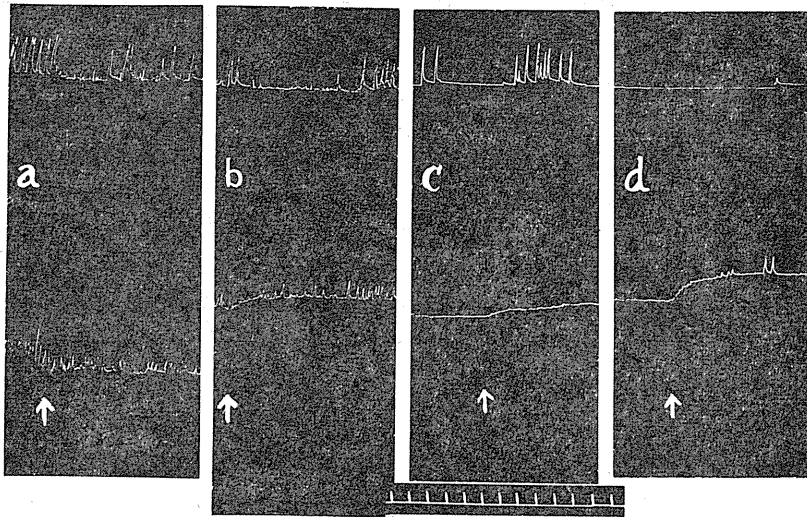


Fig. 3, B.

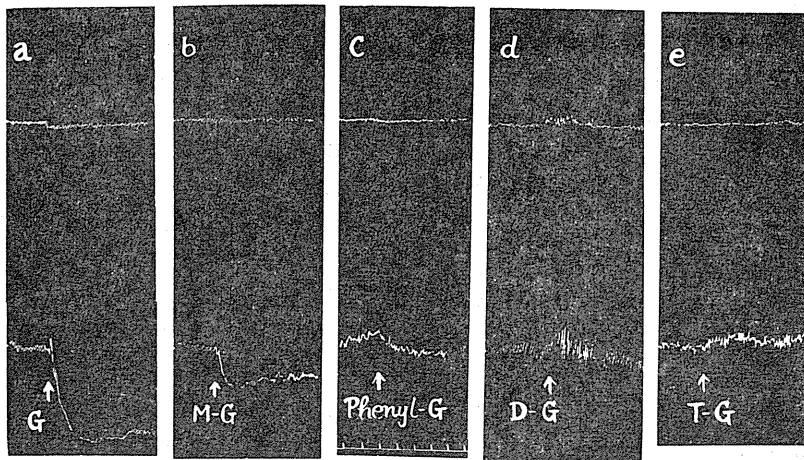


Fig. 3, C.

Effect of GABA, N-methyl-GABA, N-dimethyl-GABA, N-trimethyl-GABA and N-phenyl-GABA on a guinea pig's ileum.
 All the concentrations of test substances were $10 \mu\text{g}/\text{cc}$ except of A. e ($20 \mu\text{g}/\text{cc}$).
 Upper curve shows tracing of circular muscle and lower curve indicates tracing of longitudinal muscle in all the figures.

GABA 中, N-trimethyl-GABA の緊張増加作用が最も著明であった (第4図参照).

C) GABA のエステルの作用

GABA とアルコール類のエステルのモルモット, 家兎, 猫の回腸にたいする作用を検討した.

GABA の Methyl ester 類は, 全ての動物の回腸に対して, 常に緊張増加を生じた. GABA に著明な緊張弛緩をもって反応するようなモルモット回腸の場合に於てすら, GABA-Methyl ester には緊張増加をもって反応した. GABA-Methyl ester と N-Methyl-GABA-methyl ester の作用はほぼ同じ強さであった (第5図).

GABA の Methyl ester 類では, N に Methyl 基を1つ入れても作用はあまり変わらないが, Methyl 基を2つ入れると作用は著しく強くなり, 3つ入れると更に強くなった.

第6図は, N-Monomethyl-GABA-Methyl ester, N-Dimethyl-GABA-Methyl ester, N-Trimethyl-GABA-Methyl ester の作用をモルモット回腸で検討した例である.

GABA の Methyl ester 類の家兎回腸に対する作用も同様で, 緊張増加作用を示した. その作用の強さも $GABA < GABA\text{-Methyl ester} \approx N\text{-Methyl-GABA-Methyl ester} < N\text{-Dimethyl-GABA-Methyl ester} < N\text{-Trimethyl-GABA-Methyl ester}$ の順であった. また, GABA は $500 \mu\text{g/cc}$ で明らかな緊張増加作用をしめした

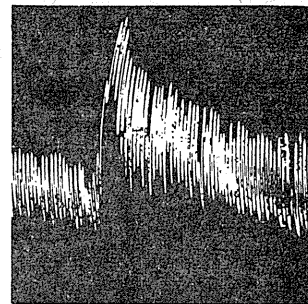
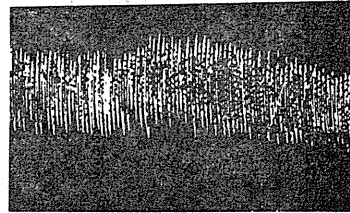
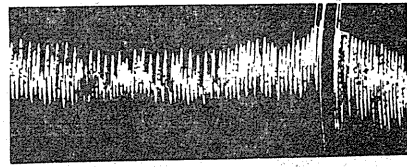


Fig. 4.

Effect of N-methyl-GABA, N-dimethyl-GABA and N-trimethyl-GABA on a rabbit's ileum.

The concentration of test substances were 0.5 mg/cc .
が, N-Methyl-GABA-Methyl ester, GABA-Methyl ester は $10 \mu\text{g/cc}$ で明らかな作用を呈した. モルモット回腸に比し, GABA-Methyl-

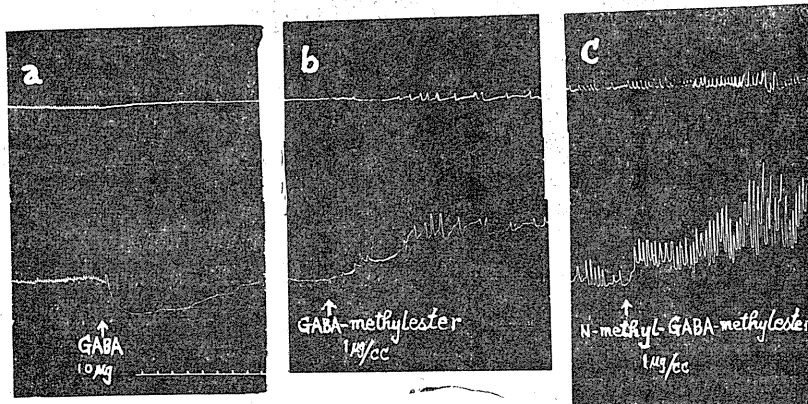


Fig. 5.

Effect of GABA, GABA-methyl ester and N-methyl-GABA-methyl ester on a guinea pig's ileum.

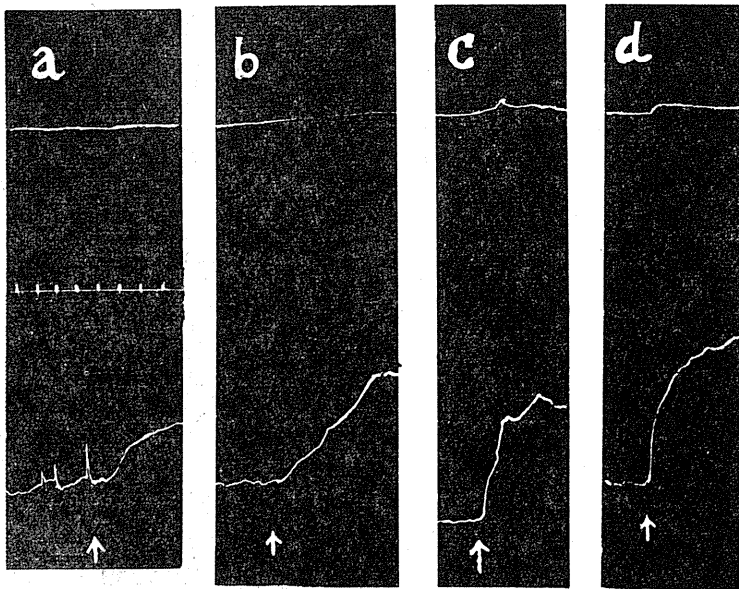


Fig. 6.

Effect of N-methyl-GABA-methylester ($1 \mu\text{g}/\text{cc}$), N-dimethyl-GABA-methylester ($0.25 \mu\text{g}/\text{cc}$), N-trimethyl-GABA-methylester ($0.025 \mu\text{g}/\text{cc}$) and ACh ($0.0002 \mu\text{g}/\text{cc}$) on a guinea pig's ileum.

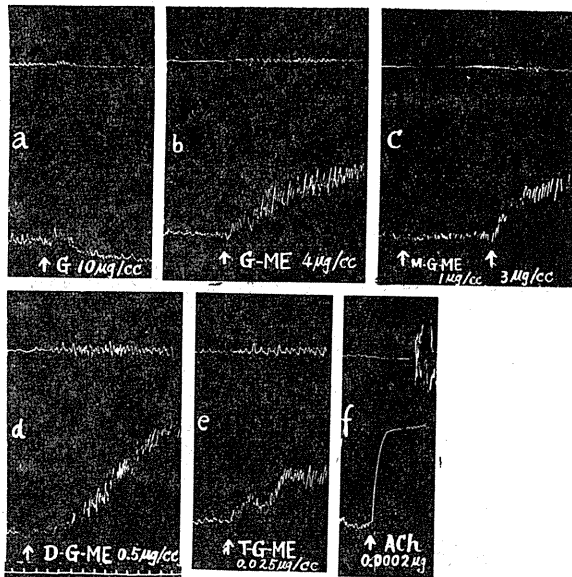


Fig. 7.

Effect of GABA, GABA-methylester, N-methyl-GABA-methylester, N-dimethyl-GABA-methylester, N-trimethyl-GABA-methylester and ACh on a cat's ileum.

ester 類の家兎回腸に対する作用も多少弱いようであった。

第7図は猫回腸に対するGABAとGABAのMethylester類の作用を検討した実験例を示す。猫回腸に対する作用は少数例でしか観察しなかったもので決定的には云えないが、まず、GABA、GABAのMethylester類の作用の強さはモルモット回腸の場合とほぼ等しいと云う印象を受けた。

次にN-Methyl-GABAのMethylester, ethylester, butylester, benzylesterの作用を比較した。N-methyl-GABA-methylesterは前述の如く緊張増加を生ずるが、N-methyl-GABA-ethylesterでは、緊張増加作用は弱くなり低濃度では弛緩すら生ずる事があり、N-methyl-GABA-butylesterでは常に緊張弛緩を生じた。

第8図はモルモット回腸にたいする、第9図は家兎回腸にたいするN-methyl-GABA-methylester, N-methyl-GABA-ethylester, N-methyl-GABA-butylesterの作用を比較した実験例を示す。

又、N-Phenyl-GABA-Methylester, N-Methyl-GABA-benzylesterも緊

張弛緩を生じた。

D) GABA 誘導体の緊張増加作用とアトロピン

GABA の methylester 誘導体の緊張作用は前述の如く、構造が Ach にくるにつれて強くなった。即ち、GABA-methylester, N-methyl-GABA-methylester の作用はほぼ同程度であったが、N-dimethyl-GABA-methylester は%濃度 (W/V) で、約10倍作用が大、N-trimethyl-GABA-methylester はその更に約10倍強力であった。又N-trimethyl-GABA-methylester の強度は Ach の約 1/100 程度のものであった。

以上の事実は、GABA の methylester の誘導体の作用が Ach と同様の機作によることを示唆していると考えられるので、これらの物質と Atropine との関係を検討した。

第10図は GABA の methylester 誘導体を作用させて、生じた緊張増加が Atropine の作用で直ちに消失し、Atropine 存在下では、何等の作用も示さないことを示す実験である。

この強い Atropine の拮抗作用は、GABA の methylester 類の作用が Ach と同一機作に基づく事を示すと云えよう。

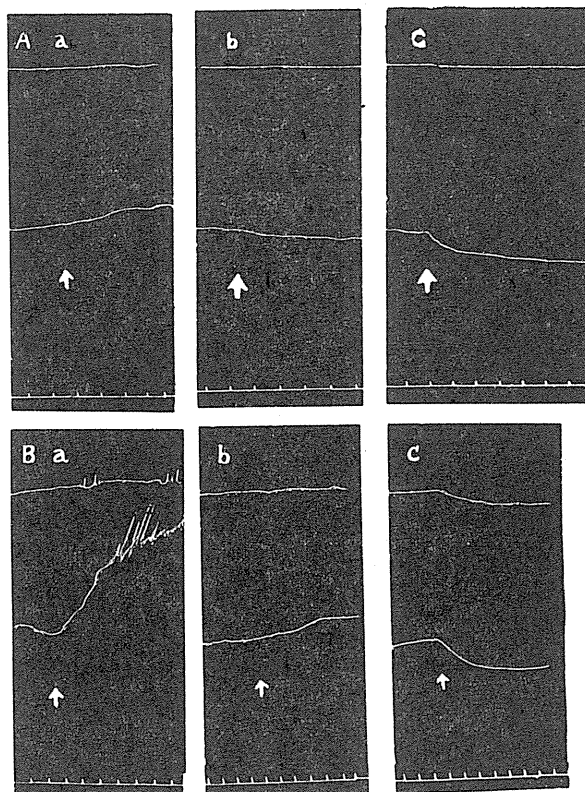


Fig. 8.

Effect of N-methyl-GABA-methylester, N-methyl-GABA-ethylester and N-methyl-GABA-butylester on a guinea pig's ileum.
A-1 μ g/cc, B-5 g α /cc.

E) ニコチン酸, ニコチン酸メチールエステ

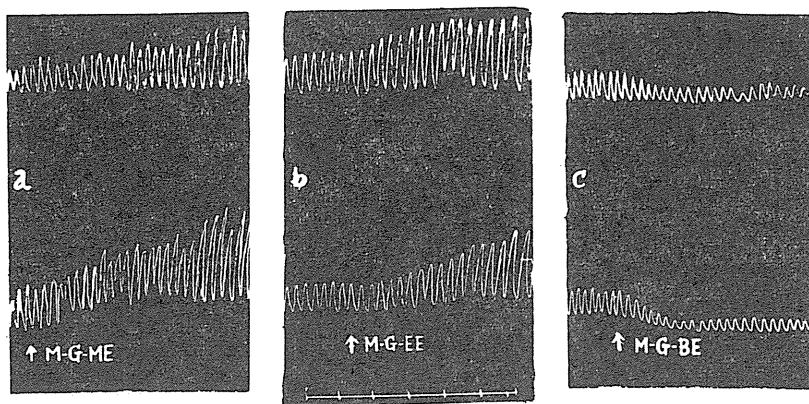


Fig. 9.

Effect of N-methyl-GABA-methylester (17 μ g/cc), N-methyl-GABA-ethylester (5.4 μ g/cc) and N-methyl-GABA-butylester (6 μ g/cc) on a rabbit's ileum.

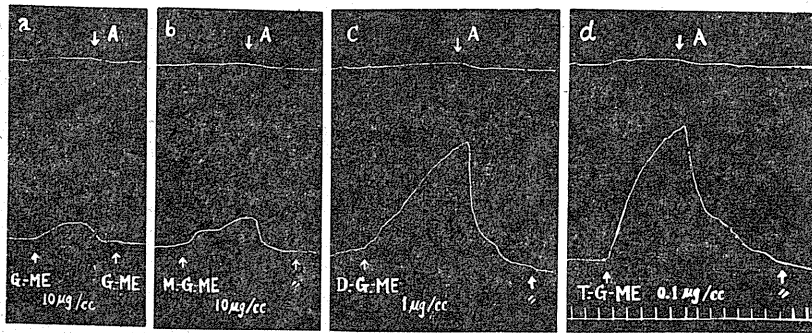


Fig 10.

Effect of GABA, N-phenyl-GABA, N-phenyl-GABA-methylester, and N-methyl-GABA-benzylester on a guinea pig's ileum.

All the concentration of test solution were 10^{-4} mole/l.

ル、イソニコチン酸、イソニコチン酸メチルエステル

ニコチン酸 (Nicotinic acid), ニコチン酸メチルエステル (Methyl-nicotinate), イソニコチン酸 (Isonicotinic acid), イソニコチン酸メチルエステル (Methyl-isonicotinate) のモルモット回腸に対する作用を比較検討した。全部 $10 \mu\text{g}/\text{cc}$ で回腸の弛緩を生じた。併しイソニコチン酸メチルエステルが最も強く、イソニコチン酸がその次で、ニコチン酸、ニコチン酸メチルエステルがそれに次ぐ。

即ち、環状で二重結合を含む場合には、メチルエステルでも、弛緩を生じ、Nが γ の位置にある時に作用が強いことが分かる。

以上の成績を総括すると、次の如くなる。

緊張増加 GABA < GABA-methylester = methyl-GABA-methylester < Dimethyl-GABA-methylester < Trimethyl-GABA-methylester < Ach : methyl-GABA-ethylester

緊張弛緩 GABA, Nicotinic acid, methyl-nicotinate, Isonicotinic acid, methyl-isonicotinate

methyl-GABA-butylester, methyl-GABA-benzylester, Phenyl-GABA-methylester

II. 考 察

GABA の腸管に対する作用に就いては、Hobbiger³⁾⁴⁾ 及び Inouye 等⁵⁾ によって、詳細

に報告されている。GABA が大黒鼠や家兎の回腸に対してよりも、モルモット回腸に於て著明なことは、Hobbiger³⁾により明らかにされているが、著者の成績もほぼ一致した。

問題なのは、GABA がモルモット回腸に於て、筋緊張の増加と弛緩の両様の作用をしめす点である。GABA の回腸にたいする作用は Hobbiger³⁾によると、モルヒネによって消失するので、Hobbiger は、これを GABA が神経組織に作用することを示すものと考えている。もしそうであるならば、GABA は神経組織に対して、二元的な作用を示すことになるので、その分析は GABA の作用様式の解明上重要なことになる。

GABA の回腸に対する作用の内、筋緊張作用の方は、GABA の構造が Ach にたいする類似性をまずにつれ、益々顕著になった。既に N-trimethyl-GABA になると、最早弛緩作用はなくなり、緊張作用のみを示した。従って、GABA の弱い緊張増加作用は Ach との構造の類似性に求める。併し、この作用は、N-trimethyl-GABA-methylester の如く、かなり Ach に構造がにできて 1/100 ほどにすぎないので比較も出来ない程弱いものである。この点が GABA が Ach と拮抗して弛緩を生ずることを可能とするものようである。

Hobbiger³⁾は GABA と Ach との拮抗を検討し、この拮抗が GABA の狭い濃度範囲での

み、認められるに過ぎないことから、GABAとAchのAch-receptorに対する競合を否定したが、これは、GABAの緊張増加作用を無視したことによって生じた一面的見解と考えられる。勿論、GABAの作用をAchとの関連に於てのみ理解出来ると云う決定的な証拠はないが、著者の成績は、GABAの作用をAchとの関連に於て理解出来る面があることを示していると云える。

GABAの作用と化学構造との関係に於て、最も重大なのはアミノ基と酸基の距離で、これが短縮しても延長しても、作用は急速に失なわれる。これはGABAのザリガニの張受容器の抑制作用⁶⁷⁾及び血圧低下作用⁸⁾の場合にも認められている。

環状化合物のイソニコチン酸が矢張り回腸に対して作用を示すが、それが弛緩のみを生ずると云うのは興味がある。そして、methylesterにしても、矢張り弛緩を生ずるのは面白いことである。これは、Achとの構造類似性がある程度遠ざかりながらも、Nと酸基の距離がAchのそれとあまり異ならないものは、Achとの拮抗を示すためなのかも知れない。併し、回腸の緊張弛緩が必ずしもAchとの拮抗で生ずる場合だけではないので、この点は更に追究しなければ結論的な事は云えない。

GABAのN置換体中、methyl-置換体は、GABAの二重的作用のために、複雑であったが、ごく大体に云えば、methyl化がすすむにつれ、緊張増加作用が強化され、弛緩作用は弱化するようであった。Phenyl置換体、Acetylationでは作用の弱化が著しかったが、これらの基はGABAのN⁺とReceptorとの結合を弱めるものと考えられる。

GABAのmethylester類の緊張増加作用はほぼAchとの構造類似に求められるが、この場合N-のmonomethyl化はあまり作用には関係なく、Dimethyl化で著しく強くなるのは、Ach及びRc化合物の作用には、少くもNに2ケのmethyl基が必要であると云う事と同様な事情にあるものと思われる。

GABAのmethylester類は所謂Reversed Carboxyl化合物でAchと同じ炭素鎖のReversed Carboxyl化合物でもVenus mercenariaの心に対する作用は1/15に減弱すと云う¹⁰⁾。

Phenyl-GABA-methylester, methyl-GABA-benzylester, methyl-GABA-butylesterが回腸の緊張弛緩を生ずるのは、Achとの拮抗によるものと考えられる。

Ⅲ. 総 括

1. 大黒鼠、モルモット、家兔、猫の回腸を使用し、GABA、GABAの誘導体及び類縁物質の作用を検討した。

2. GABA及びその誘導体の作用はモルモット、猫、大黒鼠、家兔の順に強力であった。

3. GABAはモルモット回腸に於ては、緊張増加と弛緩を生じた。猫、大黒鼠、家兔の回腸に於ても同様であった。

4. グリシン、 β -アラニン、 δ -アミノ吉草酸、 ϵ -アミノカブロン酸中では β -アラニンが軽度の弛緩作用をしめすのみで、他は作用がなかった。

5. GABAのN-置換体中、methyl-GABA, Dimethyl-GABA, Trimethyl-GABAの弛緩作用はmethyl化の進む程弱く、緊張作用は逆に強くなった。併し、GABAで緊張増加、弛緩の両方が生ずる標本では、methyl化の進む程作用が弱くなる場合もあった。

6. GABAのmethylester中、GABA-methylester methyl-GABA-methylester, Dimethyl-GABA-methylester, Trimethyl-GABA-methylesterは緊張増加作用を示した。

7. Methyl-GABA-ethylesterはmethyl-GABA-methylesterより作用弱く、methyl-GABA-butylesterは弛緩作用を示した。

8. Phenyl-GABA-methylester, methyl-GABA-benzylesterも弛緩作用を示した。

9. 環状化合物ニコチン酸、ニコチン酸メチルエステル、イソニコチン酸、イソニコチン酸メチルエステルは弛緩作用のみを生じた。

10. GABAのmethylester類の緊張作用は

Atropine の存在下で消失した。

11. 以上の成績にもとずき GABA 及びその誘導体の作用と構造の関係を Ach との関連に於て論じた。

稿を終るに当り、久保教授の御鞭と高橋助教授の御指導を深謝する。

文 献

1) Job, C. et al. (1955) Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **226**, 130

2) 池田 脩 ; (日本生理誌に発表の予定)

3) Hobbiger, F. (1958) J. Physiol. **142**, 147

4) Hobbiger, F. (1958) J. Physiol. **144**, 349

5) Inouye, A. et al. (1960) Jap. J. Physiol. **10**, 167

6) Edwards, C. & S. W. Kuffler (1959) J. Neurochem. **4**, 19

7) Elliott, K. A. C. (1958) Neurology. **8**, 98

8) Takahashi, H. et al. (1955) Jap. J. Physiol. **5**, 334

9) Schueler, F. W. and H. H. Keasling (1951) J. Pharmacol. **103**, 222

10) Welsh, J. H. and R. Taub (1951) J. Pharmacol. **103**, 62

グアニジン酸類の回腸, 血圧, 大脳皮質誘起電位に対する

作用に就いて 612. 337+612. 14+612. 825. 1]: 612. 014. 469

Effects of some guanidino-derivatives on the isolated ileum, blood pressure and cortical evoked potentials of the mammals

新井文一 (ARAI-Bunichi)*

The author has observed the effects of guanidinoacetic acid, guanidinobutyric acid and guanidinobutyryl-methylester on the isolated ileum, blood pressure and cortical evoked potentials of the mammals. And compared their effects with those of corresponding simple ω -amino acid derivatives.

最近脳内に存在する生化学的物質の機能的役割に対する関心が次第に高まって来ている。当教室に於ても脳に存在するアミノ酸の一種である γ -アミノ酪酸¹⁾²⁾³⁾の生物学的作用に就いて詳細な検討が続けられて来た。

最近、脳内に γ -グアニジン酪酸の存在することミが発見された⁴⁾⁵⁾。この酸は、構造的に γ -アミノ酪酸に似ているだけではなく、事実、腎に於ては γ -アミノ酪酸とアルギニンより生成され、脳に於ても同様な酵素的反応が予想されている⁶⁾ように生化学的にも γ -アミノ酪酸と親密な物質である。

γ -アミノ酪酸を含む一連の ω -アミノ酸と γ -グアニジン酪酸を含む一連のグアニジン酸の神経薬理学的作用の比較検討は既に Edward と Kuffler⁷⁾ 及び Purpura 等⁸⁾⁹⁾によって開始された。

著者は両アミノ酸系列の生物学的作用の比較を更に腸管血圧等に広げて観察するのみならず、これらの酸のエステルの生物学的作用をも比較した。著者の研究の目的はこの研究によって受容物質と作用物質の結合様式を究明せんとする高橋等の研究に寄与せんとするにあった。

1. 方法

モルモット、家兎、猫を使用した。モルモット、家兎の回腸片を剔出しその運動を郷原楨杆によりキモグラフィオン塗煤紙上に記録した。実験方法、実験手順は前報¹⁰⁾に詳細に記載した

ものと同様であった。頸動脈血圧は水銀マノメーターにより、呼吸は気管カニューレに連結した Marey のタンブールにより記録測定した。

大脳皮質の Direct cortical response と Transcallosal response の刺激法、誘導法は、一般に使用されている方法に順じ、当教室の既報の諸論文にくわしく記載した。

使用せる物質は全てこれら一連の研究のために、合成したものであった。特に本実験に使用した γ -グアニジン酪酸メチルエステル、 ϵ -アミノカプロン酸メチルエステルは新物質である。

これらのエステル類は全て塩酸塩を使用した。これらのエステル類は全て塩酸塩を使用した。これらのエステル類は全て塩酸塩を使用した。これらのエステル類は全て塩酸塩を使用した。

回腸片に対する物質の適用は既報¹⁰⁾に記載したと同様であった。血圧に対しては、特記しない場合には、耳静脈(家兎)、股静脈(猫)に溶液 0.2 ml を注射した。大脳皮質に対しては、濾紙法又は滴下法で、皮質表面に適用した。

II. 実験成績

モルモット、家兎の回腸に対するグアニジン誘導体と ω -アミノ酸の作用

既報¹⁰⁾の如く、 γ -アミノ酪酸 (GABA) はモルモット回腸片にたいして、1) 持続的緊張増加、2) 持続的弛緩、3) 一過性の緊張増加とそれに続く弛緩の3型の反応を生じた。

グアニジン酪酸は、 10^{-4} - 10^{-3} mole/l の濃度で、かなりの強さの緊張増加作用をしめた。その作用は、GABA が(3)型の反応を生じた標本に於て、より著明に発現するようであった。GABA が持続的緊張増加を起した標本で

* 東京医科大学生理学教室

Dept. of Physiol., Tokyo Med. College

[昭和36年1月24日受付]

は、むしろその作用は GABA に劣るようであった。併し、いずれにせよ、グアニジン酢酸は常に緊張増加のみを生じ、弛緩はおこさないと云う点で、GABA とは異っていた。

γ -グアニジン酪酸は $1-5 \times 10^{-3}$ mole/l で稀れに極めて軽度の緊張増加作用を生じた。それ以上は溶解しないので、検討は出来なかった。 ϵ -アミノカプロン酸は 10^{-2} mole/l でも何等認むべき変化を生じないので、多少前者の作用が強いように思われる。

一方、 γ -グアニジン酪酸のメチルエステルは、 10^{-4} - 10^{-3} mole/l で、著明な緊張増加を生じた。同一濃度で生じた反応の大きさの比較から、物質の作用の強さを検討すれば、 γ -グアニジン酪酸の緊張増加作用は、グアニジン酢酸よりも強い。又、 ϵ -アミノカプロン酸メチルエステルも 10^{-3} mole/l で緊張増加作用を示したが、 γ -グアニジン酪酸メチルエステルよりも弱い。GABA のメチルエステルも緊張増加作用を示す事は既に報告した¹⁰⁾が、この作用は γ -グアニジン酪酸メチルエステルよりは強い。即ち

GABA-methylester > γ -Guanidinobutyryl-

methylester > ϵ -Aminocapronyl-methylester の順となる。Guanidinoacetyl-methylester の作用は、この順位よりすれば、GABA-methylester よりも強いように予想される。併し、グアニジン酢酸メチルエステルの合成に成功しなかったので、この確認は不可能であった。

グアニジン誘導体は一般に持続的緊張増加を生ずるが、時として、この緊張増加は次第に減弱するか、かなり急速にあるレベルまで減弱し、その後はほぼ一定の緊張増加を示すと云う場合が見られた。併し、弛緩の生ずることは 1 例にも認められなかった。

第 1, 2, 3 図は、上記のグアニジン誘導体と GABA, ϵ -Aminocaproic acid, ϵ -Aminocapronyl-methylester の作用を同一標本で比較したものである。

家兔回腸片に対する ω -アミノ酸、グアニジン誘導体の作用は、モルモット回腸に対する作用と本質的には異ならないが、作用が幾分弱いようであった。

GABA-methylester 又は N-methyl-GABA-methylester の作用は γ -グアニジン酪酸メチル

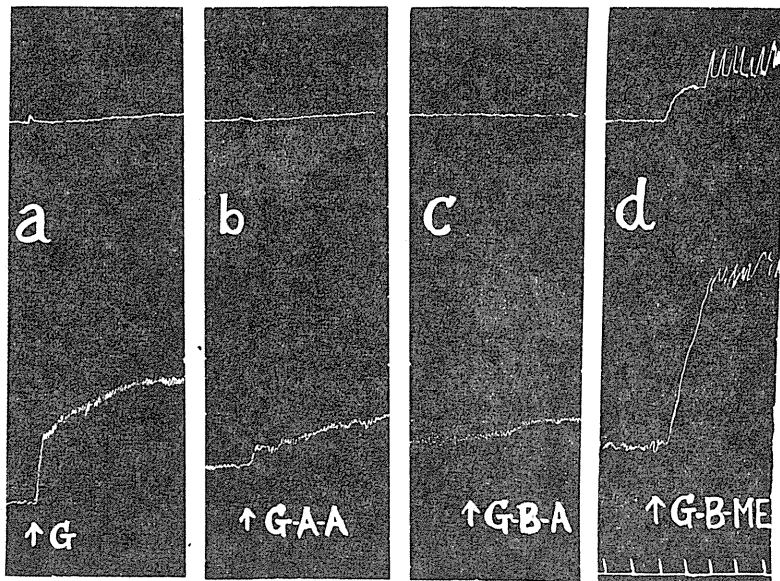


Fig. 1.

Effects of GABA, guanidinoacetic acid (G-A-A), γ -guanidinobutyric acid (G-B-A) and γ -guanidinobutyryl-methylester (G-B-ME) on an isolated guinea-pig ileum (Type I). In this and all the following figures, the upper tracing is movements of the circular muscle and the lower tracing movements of the longitudinal muscle. Time marks represent 24 sec. intervals.

エステルの作用よりも強いが，その差はモルモットの回腸に対する程著明ではなかった（第4図）。

ω -アミノ酸及びその誘導体の緊張増加作用

は $0.1 \mu\text{g/ml}$ の硫酸アトロピンで拮抗されることが，Hobbiger¹¹⁾及び Takahashi, et al.¹⁰⁾により報告されているが，グアニジン誘導体の緊張増加作用も同様に $0.1 \mu\text{g/ml}$ の硫酸アトロピ

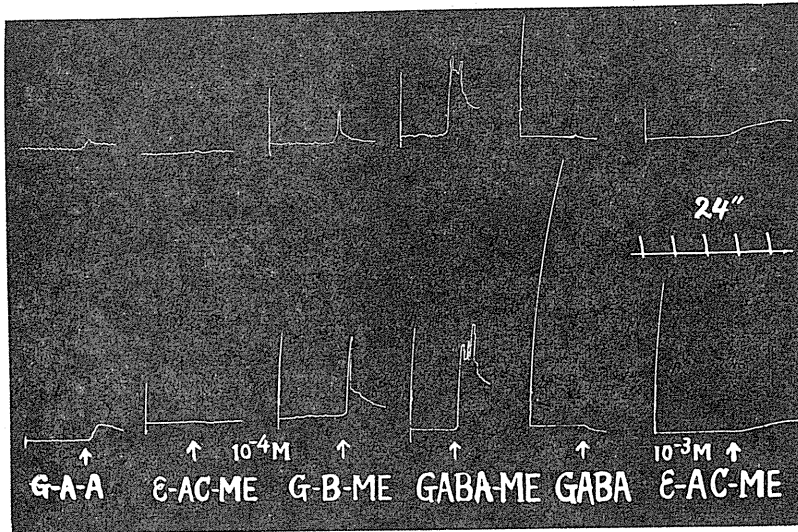


Fig. 2.

Effects of GABA, GABA-methylester (GABA-ME), ϵ -aminocapronyl-methylester (ϵ -AC-ME), guanidinoacetic acid and γ -guanidinobutyryl-methylester on an isolated guinea-pig ileum (Type II).

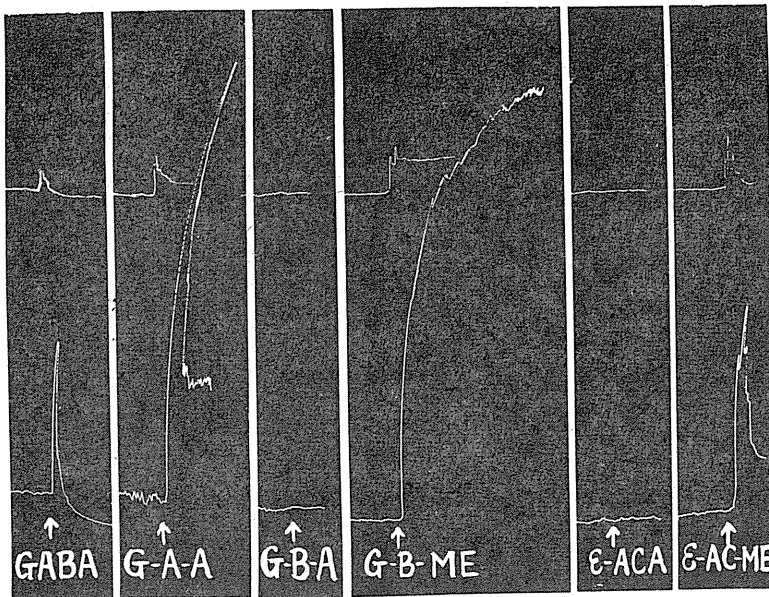


Fig. 3.

Effects of GABA, ϵ -aminocaproic acid (ϵ -ACA), ϵ -aminocapronyl-methylester, guanidino-acetic acid, and γ -guanidinobutyryl-methylester on an isolated guinea-pig ileum (Type III). All the compounds were added in 10^{-3} mole/l.

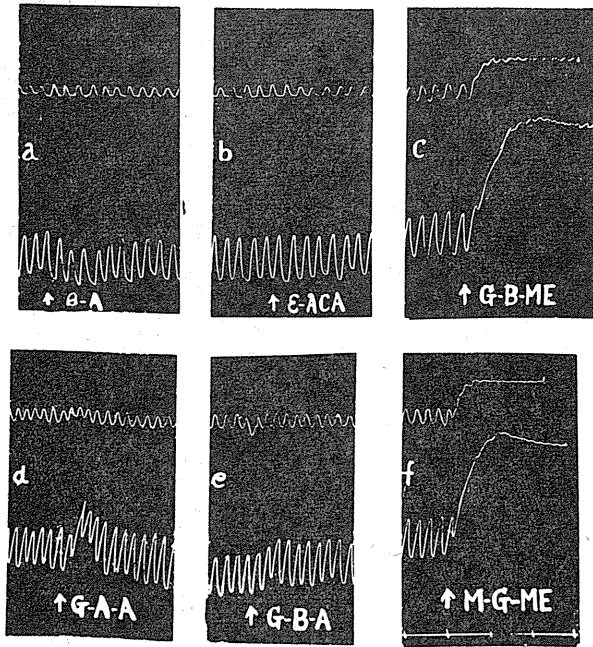


Fig. 4.

Effects of β -alanine (β -A), ϵ -aminocaproic acid, N-methyl-GABA-methylester (M-G-ME), guanidinoacetic acid, γ -guanidinobutyric acid and γ -guanidinobutyryl-methylester on an isolated rabbit ileum. All the compounds were added in 10^{-3} mole/l.

ンにより拮抗された。

GABA 及びグアニジン酢酸の抗-アセチルコリン，抗-5-hydroxytryptamine，抗-ニコチン作用

モルモット回腸に於ける GABA 及びその誘導体の抗-アセチルコリン，抗-5-hydroxytryptamine (5-HT)，抗-ニコチン作用に就いては，Takahashi 等¹²⁾が詳細に報告した。

グアニジン誘導体はグアニジン酢酸をのぞき，抗-刺戟剤-作用を示すものはなかった。グアニジン酢酸も抗-アセチルコリン作用，抗-ニコチン作用はなく，唯軽度の抗-5-hydroxytryptamine 作用を示すのみであった。

即ち 10^{-4} - 10^{-3} mole/l のグアニジン酢酸は， 10^{-10} - 10^{-9} mole/l のアセチルコリンの緊張増加作用に何等の拮抗作用も示さなかったが，GABAは 10^{-4} mole/l で可成の抗-Ach作用を示した(第5図)。

グアニジン酢酸の抗-5-HT 作用は

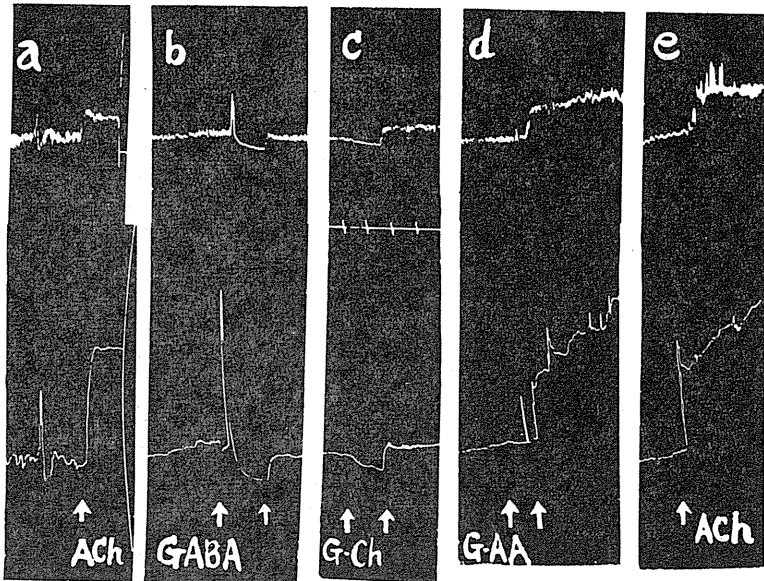


Fig. 5.

Comparison of the anti-Ach actions of GABA, γ -aminobutyryl-cholin (G-Ch), guanidinoacetic acid on the guinea-pig ileum. All the test substances (10^{-4} mole/l) were added to the organ bath before Ach (1×10^{-9} mole/l). Addition of Ach is indicated by the second arrow. In a and e Ach alone was added.

GABA の抗-5-HT 作用のほぼ 1/10 程度であった。第 6 図は GABA，及びその誘導體，グアニジン酢酸， γ -グアニジン酢酸， γ -グアニジン酪酸メチルエステル等の抗-5-HT 作用を比較したものである。本来刺激作用しか示さない物質が，GABA の如く弛緩作用をも有する物質とは異なり，一般に抗-刺激剤作用を示さないことは理解し易いことであるが，グアニジン酢酸が抗-5-HT 作用のみを示す事は興味あることと云わねばならない。

家兎及び猫の血圧に対する作用

既報¹³⁾の如く， ω -アミノ酸中にはかなり著明な家兎の血圧降下を生ずるものがあり，その中で GABA の血圧降下作用が一番強い。即ち端立するアミノ基とカルボキシ基の距離が ω -アミノ酸の血圧降下作用を決定する因子である。又，GABA の誘導體中ではエステル類がかなりの血圧降下作用を示す¹⁴⁾。

それ故，GABA，GABA-メチルエステル， ϵ -アミノカプロン酸メチルエステル，とグアニジン酢酸， γ -グアニジン酪酸， γ -グアニジン酪酸メチルエステルの血圧降下作用を比較した。

グアニジン酢酸はウレタン麻酔下の家兎に於て軽度の血圧降下作用をしめた。その作用は GABA に比し，遙かに劣った。即ち体重 kg 当り数ミリのグアニジン酢酸は可成りの血圧降下作用を生じたがその 1/10 の GABA は同程度の然もはるかに持続の長い血圧降下を生じた。

一方，グアニジン酢酸は軽度の一過性の呼吸増大作用を示した。一方 GABA は一過性の呼吸抑制とそれに続いて軽度の呼吸増大を生じた。 γ -グアニジン酪酸は殆ど認むべき血圧降下を生じなかった。一方， γ -グアニジン酪酸メチルエステルはかなり強い血圧降下作用を示したが，GABA-メチルエステルよりは弱かった。

一方， ϵ -アミノカプロン酸には血圧降下作用は認められなかったが， ϵ -アミノカプロン酸メチルエステルは明らかな血圧降下作用をしめた。併しながら，その作用は γ -グアニジン酪酸

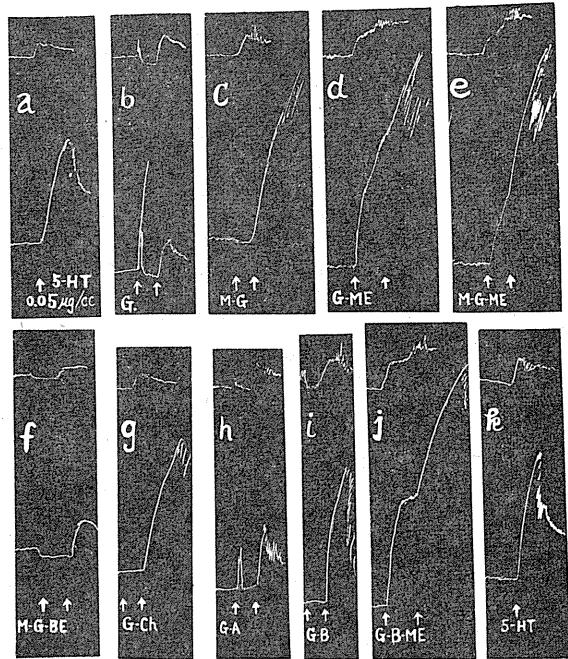


Fig. 6.

Comparison of the anti-5-HT actions of GABA, N-methyl-GABA (M-G), GABA-methylester (G-ME), N-methyl-GABA-methylester (M-G-ME), N-methyl-GABA-butylester (M-G-BE), GABA-choline (G-Ch), guanidinoacetic acid, γ -guanidinobutyric acid and γ -guanidinobutyryl-methylester on the guinea-pig ileum. Guanidino-derivatives were added in 10^{-3} mole/l and others were added in 10^{-4} mole/l. The second arrow indicates addition of 5-hydroxy-tryptamine (5-HT, 0.05 μ g/ml). In a and k. 5-HT alone was added.

メチルエステルよりも大部弱かった。

第 7 図は GABA，GABA-メチルエステル，グアニジン酢酸， γ -グアニジン酪酸， γ -グアニジン酪酸メチルエステルの血圧降下作用の比較を，第 8 図は GABA-メチルエステル， ϵ -アミノカプロン酸メチルエステル， γ -グアニジン酪酸メチルエステルの血圧降下作用を検討したものである。

GABA 及び GABA のエステル類の血圧降下作用が家兎と猫に於てかなりの相異のある事は既に報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。即ち GABA は猫に於ては血圧降下作用が弱くしばしば血圧降下と血圧上昇の二作用を示す。又 GABA-メチルエステルの血圧降下作用は猫の場合には GABA

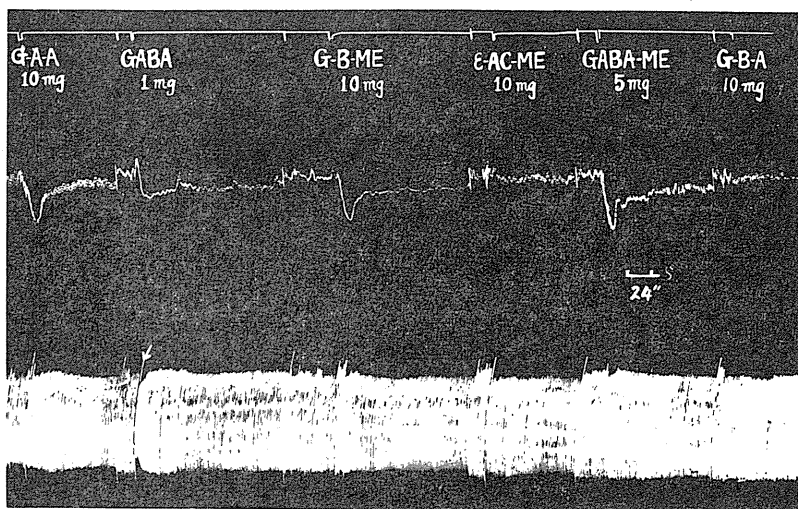


Fig. 7.

Effects of GABA, GABA-methylester, guanidinoacetic acid, ϵ -aminocapronyl-methylester and γ -guanidinobutyryl-methylester on blood pressure and respiration of a rabbit (2.4 kg) under urethane anesthesia.

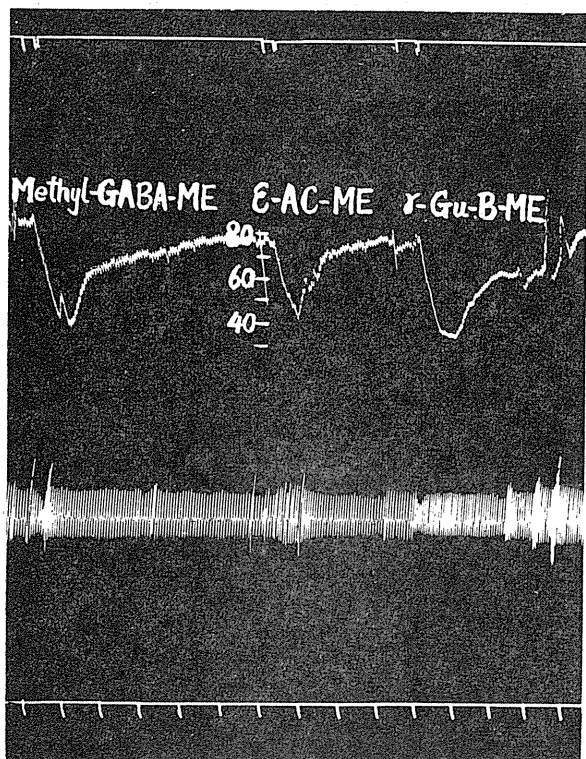


Fig. 8.

Comparison between the effects of ϵ -aminocapronyl-methylester, GABA-methylester and γ -guanidinobutyryl-methylester on blood pressure and respiration of a rabbit (1.9 kg) under urethane anesthesia. Each compound was applied intravenously 10 mg per animal.

より強い等である。

興味ある事に、猫に於てはグアニジン酢酸の血圧降下作用は GABA より著明であった。又、 γ -グアニジン酢酸も軽度であるが血圧降下を生じた。一方、 γ -グアニジン酢酸メチルエステルは酸よりも遙かに強い血圧降下を生じた。GABA-メチルエステルと γ -グアニジン酢酸メチルエステルの作用の差異は家兎に於ける程著明でなかった。その他の点では家兎の場合に見た処と同様であった(第9図)。

家兎及び猫の大脳皮質に対する作用

家兎及び猫の大脳皮質の Direct cortical response と Transcallosal response に対する ω -aminoacids 及びその誘導体と Guanidino-誘導体の作用を比較、検討した。

GABA とグアニジン酢酸は、Direct cortical response の Initial negative spike の抑制、Secondary negative wave の軽度の疎通を生じた。高濃度を作用させた場合には、Initial negative spike は完全に消失し、その代りに陽性波があらわれた。この陽性波にゆっくりした表面陰性波が続いた。時には、この陰性波に続

いて，頻度 10-13 cps の反復する陽性波が生じた。第10図は，グアニジン酢酸のDirect cortical response に対する作用を示す。

GABA 及びグアニジン酢酸のTranscallosal response に対する作用は，表面陰性波の抑制，陽性成分は陰性波の消失に伴い振幅増大と持続

の延長をうける。この陽性波に続いてゆっくりした陰性波が続いた。この陰性波は作用前に見られた陰性波よりも潜時が長く，経過はるかに長いものであった。一方， ϵ -アミノカプロン酸， γ -グアニジン酪酸はDirect cortical response の Initial negative spike にはあまり作用しない

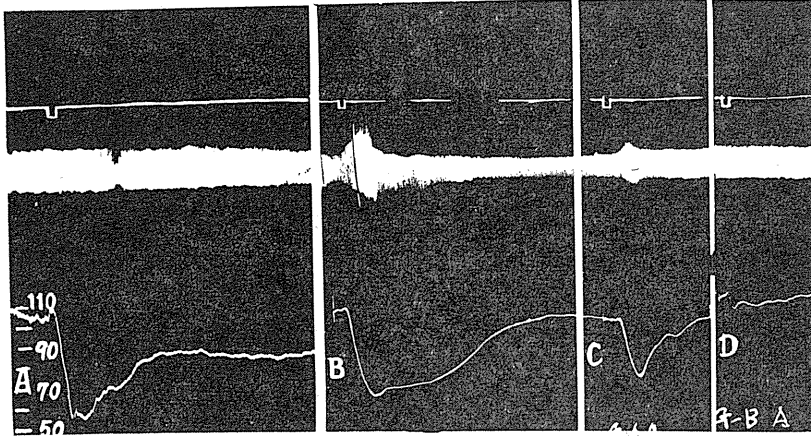


Fig. 9.

Effects of N-methyl-GABA-methylester (A), γ -guanidinobutyryl-methylester (B), guanidinoacetic acid (C) and γ -guanidinobutyric acid (D) on blood pressure and respiration of a cat (2.2 kg) under urethane anesthesia. Each compound was administered 10 mg per animal.

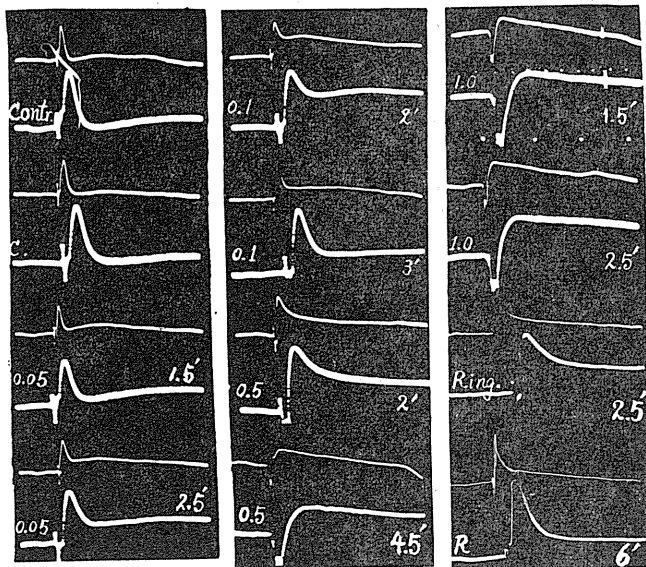


Fig. 10.

Series of oscillographic records of direct cortical potential produced by single shock applied to cortical surface of post sigmoidal gyrus of cat under pentobarbital anesthesia. Numerals on the left side of each record indicate concentrations of guanidinoacetic acid in percentage and those on the right side time in minute after application. Upper tracings of individual records are recorded by slower sweep and lower tracings by faster sweep.

で, Secondary negative wave を撰択的に増大した. また, Transcallosal response に対しては, 陰性成分のみの増大を生じた.

ϵ -アミノカプロン酸, γ -グアニジン酪酸のメチルエステルは, Direct cortical response と Transcallosal response にたいして, 酸と同様の作用をしめした. 第11図は γ -グアニジン酪酸メチルエステルの Direct cortical response と Transcallosal response に対する作用を示す.

Ⅲ. 考 察

ω -アミノ酸とグアニジン酸の回腸, 血圧, 大脳皮質に対する作用を見ると, 端立するアミノ基とカルボキシル基の距離が, その作用を決定することは, Crayfish の Stretch receptor cell の場合⁷⁾と同様であった.

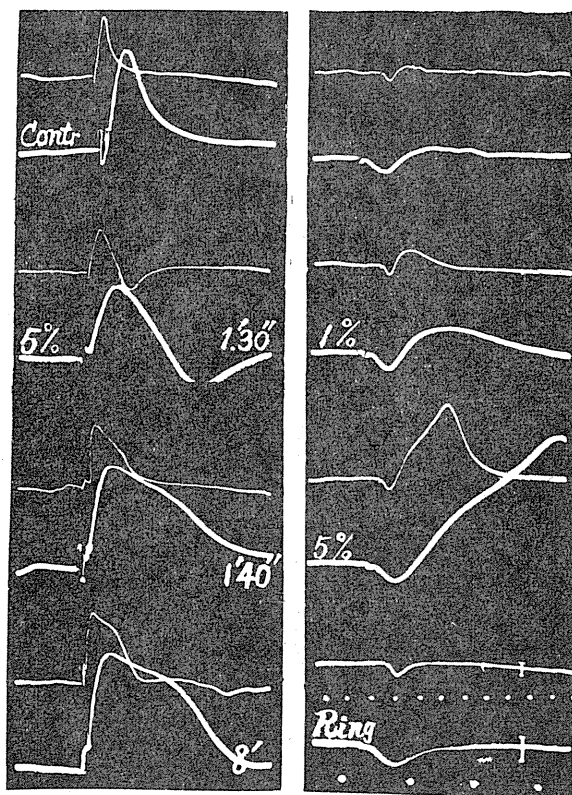


Fig. 11.

Effect of γ -guanidinobutyryl-methylester on the direct cortical response (the left column) and the transcallosal response (the right column) of a cat.

又, ω -アミノ酸とグアニジン酸とでは, 炭素数の2つ少ないグアニジン酸と ω -アミノ酸が対応することは, Crayfish の Stretch receptor cell の場合と同様であった.

併しながら, GABA とグアニジン酪酸の作用を比較すると多少の差異がみとめられた. 即ち, モルモット回腸にたいして, GABA は緊張増加と弛緩を生ずるのに, グアニジン酪酸は緊張増加しか生じない事であった. この事は, GABA が抗-刺戟剤作用を示すのに, グアニジン酪酸は抗-5-HT 作用の外は示さないこと, 特に GABA が抗-Ach 作用を示すのに, グアニジン酪酸はこの作用をもっていないことに関係があると思われる.

GABA とグアニジン酪酸の作用の差は血圧の場合にはもっと複雑であった. 即ち家兎では, GABA の方が遙かに降圧作用が強いが, 猫ではグアニジン酪酸の方が作用が強いのである. これは家兎では GABA が著明な中枢性作用を示すのに, グアニジン酪酸は家兎でも末梢性の作用しかないためであると思われる.

ϵ -アミノカプロン酸と γ -グアニジン酪酸の回腸刺戟作用及び降圧作用は, 後者の方が多少強かった. 特に ϵ -アミノカプロン酸と γ -グアニジン酪酸のメチルエステル間の作用の差はかなり著明で, 後者の方が強力であった.

併しながら, 上述の差異は大脳皮質の場合には, 殆ど認められなかった.

こう云う ω -アミノ酸系列とグアニジン酸系列の作用の差は, グアニジン酸には端立するNの外にもう1つNが存在することにあるのであって, この構造の差が組織の受容物質の構造の差との相関によって, 作用の差の大小となって現われるものと考えられる.

Ⅳ. 総 括

モルモット, 家兎, 猫を用いて, ω -アミノ酸とグアニジン酸の生物学的作用を

比較検討した。

1. グアニジン酢酸は 10^{-4} - 10^{-3} mole/l でモルモットの回腸片に対してかなり著明な緊張増加作用をしめた。一方、 γ -グアニジン酢酸は 10^{-3} mole/l でまれに極めて軽度の緊張増加をしめることがあった。一方 GABA は、緊張増加と弛緩を生じた。又 ϵ -アミノカプロン酸は 10^{-2} mole/l でも何等の変化も与えなかった。

2. γ -グアニジン酢酸メチルエステルの回腸刺戟作用は、GABA-メチルエステルより弱く、 ϵ -アミノカプロン酸メチルエステル、グアニジン酢酸より強い。

3. グアニジン酢酸は抗-Ach、抗-ニコチン作用は示さなかったが、軽度の抗-5-HT 作用をもっている。その作用は、GABA の1/10以下であった。

4. 家兎回腸に対しても、グアニジン誘導体は同様の刺戟作用を示した。

5. モルモット回腸に対するグアニジン誘導体の刺戟作用は 0.1 μ g/ml のアトロピンによって拮抗された。

6. グアニジン酢酸は家兎に於ては、軽度の降圧作用を示したが γ -グアニジン酢酸には殆ど降圧作用は認められなかった。一方、 γ -グアニジン酢酸メチルエステルの降圧作用は GABA-メチルエステルより弱く、 ϵ -アミノカプロン酸メチルエステルより強かった。家兎に於ては GABA がグアニジン酢酸に比して遙かに強い降圧作用を示す事が特記すべきことであった。

7. 猫に於ては、グアニジン誘導体の降圧作用は、一般に、家兎に於けるよりも著明であった。グアニジン酢酸の降圧作用は GABA よりも著明であった。

8. 大脳皮質の Direct cortical response においては、GABA、グアニジン酢酸は Initial negative spike の抑制、Secondary negative wave の軽度の疎通を生じた。高濃度では、Initial negative spike は消失し、その代りに陽性波が生じ、それに続いてゆっくりした陰性波と時に 10-13 cps の反復性陽性波が生じた。

9. Transcallosal response に対しては、両

者は陰性成分を抑制した。これを完全に消失させると、陽性成分の増大、延長が生じ、これに続き、ゆっくりした陰性波と、時に反復性の陽性波を生じた。

10. ϵ -アミノカプロン酸と γ -グアニジン酢酸は Direct cortical response の Initial negative spike にはあまり変化をあたえず、Secondary negative wave の撰択的な増大を生じた。

11. Transcallosal response に対しては、両者は陰性成分を増大し、陽性成分には変化を生じなかった。

12. ϵ -アミノカプロン酸メチルエステル、 γ -グアニジン酢酸メチルエステルは、Direct cortical response、Transcallosal response に対して、酸と全く同様の作用を示した。

稿を終るに当り、久保教授の御鞭撻と高橋助教授の御指導を深謝致します。

文 献

- 1) Awapara, J., Landua, A. J., Fuerst, R. and Seale, B. (1950) J. Biol. Chem. **187**, 35
- 2) Roberts, E. & Frankel, S. (1950) J. Biol. Chem. **188**, 789
- 3) Udenfriend, S. (1950) J. Biol. Chem. **187**, 65
- 4) Jirreverre, F., Evans, R. L., Hayden, A. R. and Silber, E. (1957) Nature, **180**, 704
- 5) Pisano, J. J., Mitoma, C. and Udenfried, S. (1957) Nature, **180**, 1125
- 6) Pisano, J. J., Wilson, J. D. and Udenfried, S. (1960) Inhibition in the nervous system and GABA. ed by E. Roberts et al. N. Y. USA.
- 7) Edwards, C. and Kuffler, S. W. (1959) J. Neurochem. **4**, 19
- 8) Purpura, D. P., Girado, M. and Grundfest, H. (1958) Science, **127**, 1179
- 9) Purpura, D. P., Girado, M., Smith, T. C. and Gomez, J. A. (1958) EEG Clin. Neurophysiol. **10**, 677
- 10) Takahashi, H., Uchikura, K., Kumei, K. and Ikeda, O. (1961) Jap. J. Physiol. in press.
- 11) Hobbiger, F. (1958) J. Physiol. **142**, 147
- 12) Takahashi, H., Nagashima, A. and Arai, B. (1960) Jap. J. Physiol. **10**, 106
- 13) Takahashi, H., Tiba, M., Iino, M. and Takayasu, T. (1955) Jap. J. Physiol. **5**, 334
- 14) Takahashi, H., Koshino, C. and Ikeda, O. (1961) Jap. J. Physiol. in press.
- 15) Takahashi, H., Koshino, F. and Ikeda, O. (1961) Jap. J. Physiol. in press.

ヒキガエルの肺筋緊張に及ぼす塩類ならびに

滲透圧の変化の影響 612.215.3:612.014.462/3

Effects of changes in salt concentration and in osmotic pressure of the surrounding fluid upon the muscle tone of the isolated toad lung

高橋久仁男 (TAKAHASHI-Kunio)*

The change in the smooth muscle tone of the lung caused by changes in salt content and in osmotic pressure of surrounding fluid were studied in the isolated lung preparation of Japanese toads.

In winter the increase in NaCl content caused a fall in pulmonary muscular tone. But, in summer the muscular tone fell only when the NaCl-increase was small (to about 2×), and the tone rose with the further increase in NaCl content. The decrease in NaCl content caused always a rise in muscular tone.

The effect of the increase in osmotic pressure was considered as to be essentially in the fall in muscle tone. But, under the existence of NaCl, the osmotic pressure increase seemed to act as if the NaCl content increased. The decrease in osmotic pressure showed the reverse effect.

The increase in KCl concentration caused a rise in tone which was larger in summer and smaller in winter. This effect was almost symmetrically reverse with that of NaCl-increase. The effect of KCl-decrease could not be clearly detected.

The development of the automatic pulmonary contraction and the maintenance of ACh-sensitivity seems to require a definite range of the external fluid composition. This range may show a seasonal variation which relates to the seasonal variation of the body fluid composition of the animal.

ヒキガエルの肺は、それを摘出することによって著しい緊張増加をしめし、それは摘出肺を Ringer 液に浸すことによって、さらに著しくなる¹⁾²⁾³⁾。そして、この緊張増加にともなって、ほとんどつねに、相動性の自働収縮が現われてくる⁴⁾⁵⁾。この自働収縮は諸種の刺激に対する肺筋の反応の判定を困難にさせるので¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、著者は肺筋の生理的性質をほとんど変えることなしに自働収縮の発現を抑制することができないかと考えた。

自働収縮は摘出、Ringer 液の使用という操作によって誘発される傾向が強く認められるので、液性環境の変化が重要な誘発動機になっているのではないかと考え、Ringer 液の塩類濃度や滲透圧を変えて、その影響をみた。その結

果、Ringer 液の組成の変化は肺筋の緊張にかなり著明な影響を与え、それは自働収縮の変化とも無関係ではないことを知った。この成績のうち、自働収縮に関するものの一部はすでに報告したが⁵⁾、ここでは主としてその際の緊張の変化について報告してみたい。

I. 実験方法

ヒキガエルは捕獲後、砂土中に保管した体長 9-15 cm のものを雌雄の別なく使用した。実験期間は1958年6月から1960年11月の間であり、夏季(4月下旬-10月上旬)と冬季(11月上旬-3月上旬)を通じて実験は常に室温において行った。

肺は脊髄を破壊したのち胸壁を開き、血管、神経と共に肺口部で切断して摘出した。摘出肺はただちに内部の空気を抜き、Fig. 1 の如く肺尖部を Ringer 液槽の底部に固定し、肺口部を

* 新潟大学医学部生理学第2教室
2nd Dept. of Physiol., Niigata Univ. School of Med.
〔昭和36年1月25日受付〕

セルフィンでつまんで描記槓杆につなぎ、肺の長さの変化をすず紙に記録した。なお、懸垂肺の肺口部の結紮の有無は実験成績に差異を来さ

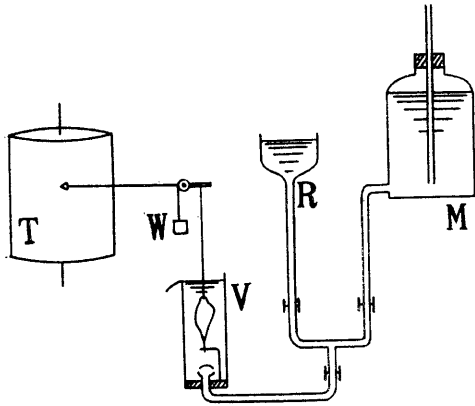


Fig. 1.

Experimental arrangement. M: Mariotte's bottle, R: Reservoir for the test solution, V: Bath for the preparation, W: Weight for the stretch of preparation, T: Kymograph.

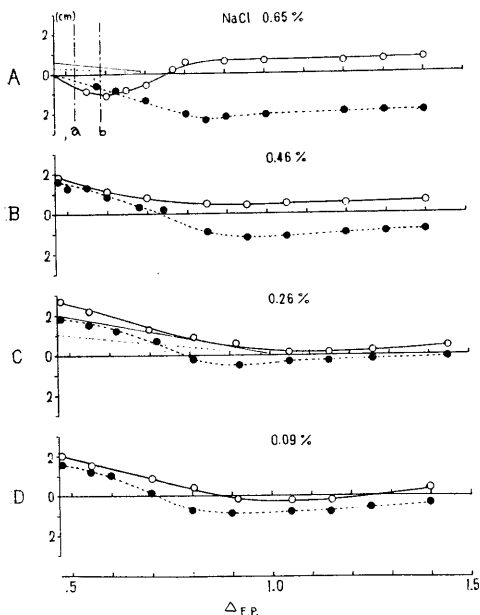


Fig. 2.

Changes in pulmonary muscle tone with increase in osmotic pressure of the bath fluid under various concentration of NaCl. Open circle (○) indicates the tone in summer, and closed circle (●) in winter. Thinner solid and broken lines in A and C indicate the height of spontaneous contractions in summer and in winter, respectively.

なかった。槓杆に 6-25 g の重錘をつけることにより、懸垂肺に 1-5 g の伸展負荷を与えた。

浴槽の容量は 100 ml で、標準 Ringer と試験液との相互の交換は総量 0.5-1 l の液を浴槽の底部から肺に機械的刺激を与えないように緩徐に送ることによって行った。試験液の滲透圧は実験の最初において、実験時と同様な条件で浴液の組成を変え、あるいはそれを交換したときの浴槽内の液を、氷点降下法によって測定し、各条件における値を求めておき、実験のたびごとに測定する煩雑さを避けた。

薬物は液槽中に直接ピペットを用いて注加し、静かに混和した。その洗い去りには前記の浴液交換の場合と同じ方法で行った。

実験に用いた標準 Ringer 液の組成は NaCl 0.65%, KCl 0.02%, CaCl₂ 0.024%, NaHCO₃ 0.02-0.04%, その氷点降下は -0.47°C, pH は 6.8-7.0 である。なお、この実験に用いた描記槓杆は等張力槓杆であり、等長さ槓杆でないので、得られた曲線は緊張の変化をそのまま示すものではないが、このような緊張性の長さの変化は緊張の変化の 1 つの指標となり得るであろう。この報告でいう緊張とはこのような緊張性の長さの変化である。緊張変化の値としては、浴液を変えてから 20-50 分後の値をとった。

II. 実験成績

A. 滲透圧増加の影響 (Fig. 2, A)

Ringer 液にブドウ糖を加えてその滲透圧を増加させると、夏においては、増加の程度の小さいときは緊張が下り、増加の程度が大きくなるにつれて緊張は再び高まり、標準滲透圧の約 1.5 倍の附近でもとの緊張をこえる。冬においては、滲透圧増加は緊張の増加を来すことなく、つねにその抑制を来すが、滲透圧約 2 倍 (氷点降下 -0.9°C) 附近を極小点として再び上昇する傾向がある。

自働収縮は緊張の極小点附近で消失するが、冬ではこの極小点に達する以前に消失することが多い。緊張変化の曲線は標本によって起始点がずれて、たとえば図中に a, b で示したよう

な点から始まることがある。たとえば b からはじまるような夏の標本では滲透圧増加のみを来たし、また標準 Ringer 液中では自働収縮はわずかにしか、あるいはほとんど全く現われないことになる。この場合は滲透圧を標準より下げることによって、緊張は b 点からこの曲線を左方にたどって増加し、また、きわめて微弱、あるいはほとんど現われていなかった自働収縮を誘起させる事ができる。このことは、ある刺激に対する反応が刺激前の緊張のいかんによって影響をうけるというよく知られた事実の一面を示しているものといえよう。

ACh による相動性の収縮は自働収縮の消失する点よりさらに高滲透圧のところまで保たれるが、収縮高は圧の上昇とともに減少する。

これらの緊張変動は可逆的であり、浴液を標準 Ringer 液にもどすことによって、ほぼもとの緊張に復する。

B. 滲透圧変化による緊張変化に及ぼす NaCl 濃度の影響 (Fig. 2)

NaCl の濃度を標準濃度 0.65% 以上の種々の濃度に一定に保ったまま、ブドウ糖添加によって滲透圧を上げていったときの緊張変化は冬においては、標準 NaCl 濃度における滲透圧変化とほとんど同じ経過を示し (Fig. 2, A-D), その時の NaCl 濃度に応じた緊張増加の分だけ曲線がほぼ平行に上に移動するにすぎない。しかるに、夏においては冬におけるが如き平行的な経過はみられず、標準 NaCl 濃度における前記の二相性の変化が NaCl 濃度の低下につれて冬のものに近似した単相性の経過に変わっていくのがみられる。

滲透圧を NaCl 添加によって上げた場合の緊張変化 (Fig. 3, A, Fig. 4) は前記 A 項のブドウ糖による滲透圧増加のときと同様な経過を示すが、その程度が著しい。自働収縮はやはり緊張の極小点附近で消失する。ACh 収縮は自働収

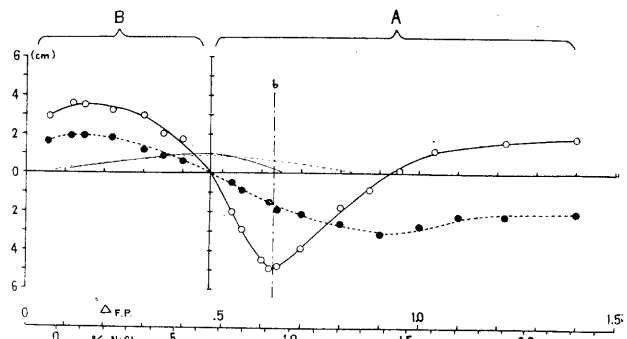


Fig. 3.

Changes in pulmonary muscle tone with increase (A) and decrease (B) in NaCl-concentration of Ringer solution. The osmotic pressure varies with the NaCl-concentration. Open circles indicate the tone in summer, and closed circle in winter. Thinner solid and broken lines indicate the height of spontaneous contraction in summer and in winter, respectively.

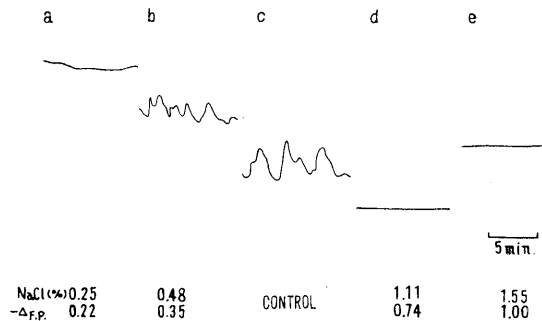


Fig. 4.

Changes in tone and spontaneous contractions with changes in NaCl-concentration of Ringer solution.

縮よりやや高 NaCl, 高滲透圧の点まで残るようである。

この場合も標本によって曲線の起始点が右あるいは左にずれていることがある。たとえば b 点にずれていたときは、標準 Ringer 液では自働収縮がほとんど認められず、NaCl と滲透圧を減らすことによって緊張が増加するとともに自働収縮が起ってくる。

C. 滲透圧減少 (NaCl 濃度減少) の影響 (Fig. 3, B, Fig. 4)

滲透圧を下げるには KCl, CaCl₂ を標準 Ringer 液と等しく溶かした蒸留水を添加していく方法をとった。このときは滲透圧 (NaCl 濃度) の減少に伴って緊張は増加し、その極大点

は滲透圧 1/3-1/5 ($\Delta -0.1 - -0.2^\circ\text{C}$) の附近である。これらの緊張変化も可逆的であるが、肺を蒸留水に浸した場合には、時間とともに進行する不可逆的の緊張低下がおこる。

自働収縮は滲透圧の減少に伴って小さくなり、その頻度は大となり、緊張の極大点附近で消失する。ACh 収縮も自働収縮とほぼ同様の傾向を示すが、極めて低滲透圧の部分で収縮高が上る傾向がある。これは Corsten¹⁷⁾のいう蒸留水処理による ACh 感受性の増大と関係があるかも知れない。

冬は夏にくらべて、変化の程度がやや小さいが、質的な差はない。

一部の実験では KCl, CaCl₂ を含まない蒸留水を添加したが両者の間には著しい差を認めえなかった。すなわち KCl, CaCl₂ の減少の効果はこの実験の範囲内では認められなかった。

D. NaCl 濃度減少の影響

Ringer 液の NaCl を等張ブドウ糖で置換して、滲透圧を下げることなしに NaCl 濃度を減らした場合の緊張の変化は、前記C項 (Fig. 3,

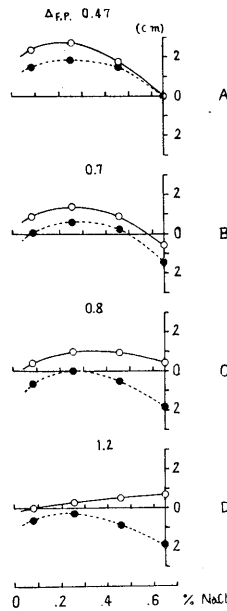


Fig. 5.

Changes in pulmonary muscle tone with decrease in NaCl-concentration under various osmotic conditions. Open circles indicate the tone in summer, and closed circles in winter. Thinner solid and broken lines indicate the height of spontaneous contractions in summer and in winter, respectively.

B) の滲透圧とともに減ったときとほぼ同様の緊張変化、自働収縮の消退、ACh 収縮の減弱がみられる。その程度は夏においては NaCl, 滲透圧ともに減った場合よりやや小さく、冬においてはほぼ等しい。

滲透圧をいろいろの値に一定に保って NaCl 濃度を減少させた場合の緊張変化を Fig. 5 に示す。冬における緊張変化の曲線は各滲透圧においてほとんど変わらないが (A, B), 夏においては滲透圧が高くなるにつれて, NaCl 濃度の比較的高いところの緊張が高くなり (C, D), 曲線の右半分が上にもち上げられたような形になる。これは夏においてのみ認められた高滲透圧による緊張上昇 (Fig. 3, A) の結果である。

以上, A-D 項に述べたすべての場合 (C項における蒸留水添加の例を除いて) において KCl, CaCl₂ の濃度は標準 Ringer 液中の濃度

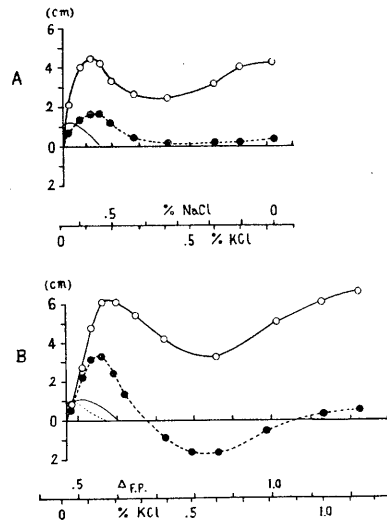


Fig. 6.

Changes in pulmonary muscle tone with increase in KCl-concentration. In A, KCl was substituted for equimolecular NaCl, and consequently the osmotic pressure was unchanged, but NaCl decreased with KCl-increase. In B, KCl was added without any substitution to Ringer solution, and consequently NaCl-concentration was unchanged, but the osmotic pressure increased with KCl-increase. Open circles indicate the tone in summer, and closed circles in winter. Thinner solid and broken lines indicate the height of spontaneous contractions in summer and in winter, respectively.

と変わらない。

E. KCl濃度増加の影響 (Fig. 6, A, B)

Ringer 液の NaCl を KCl で置換していくと, KCl 濃度 5-8 倍位まで著明な緊張増加があり, それより KCl 濃度が上ると緊張は低下しはじめるが原緊張より下がることはない. 夏では極めて高濃度で緊張の再上昇がみられる (Fig. 6, A).

標準 Ringer 液の NaCl を減らすことなく, KCl を添加した場合の緊張変化の曲線 (Fig. 6, B) も上記の NaCl を KCl で置換した場合のもの (Fig. 6, A) とよく似ている. ただし, 後者では前者にくらべて変化がやや大きいこと, および冬においては緊張の減少が原緊張以下にまで到りうるものが異っている. しかし, いずれの場合も KCl 濃度 0.5% 以下における緊張の変化は NaCl 濃度増加による緊張の変化とほぼ対称的であることは興味がある.

Fig. 6 の A と B との差異は, 前者においては NaCl 減少による緊張上昇効果が介入し, 後者においては浸透圧上昇による緊張漸減効果が介入していることが原因となっているものであらう.

自動収縮は, KCl 増加が約 2-4 倍までは収縮高が大となり, かつ, それに伴って頻度はわずかに小さくなる傾向があるが, それ以上の KCl 増加によっては減少し頻度は増加する. そして, 自動収縮は緊張の極大点附近で消失するが, KCl 増加による収縮頻度の増加は前報⁵⁾の如くきわめて著しく, 特異である (Fig. 7).

ACh 収縮は KCl 濃度上昇とともに小さくなり, 自動収縮の消失する濃度よりやや高い濃度で消失する.

F. CaCl₂の影響

Ringer 液の NaCl を CaCl₂ で置換するとき, あるいは Ringer 液に CaCl₂ を添加していくときは, その濃度があまり高くない場合 (0.2% 以下), 前者においては NaCl 減少による緊張の増

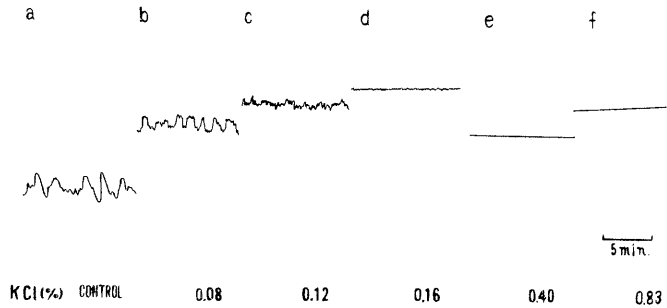


Fig. 7.

Changes in tone and spontaneous contractions of the pulmonary muscle with increase in KCl-concentration in bath solution. The osmotic pressure increased with KCl-increase.

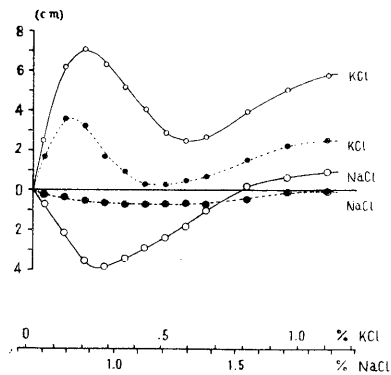


Fig. 8.

A curve obtained by subtraction of the curve in Fig. 2, A and in Fig. 6, B from that in Fig. 3, A. The curves may be considered as indicators suggesting the tone change in response to NaCl-increase alone (thick curves) and that to KCl-increase alone (thin curves) in summer (O) and in winter (●).

加を抑制し, 後者においては浸透圧の上昇による緊張の低下を抑制する. CaCl₂ 添加による NaCl 減少, あるいは浸透圧が少くない場合にはこのような抑制はおこらない.

G. 季節差

夏季と冬季における溶液性状の変化による緊張変化の差異は上記の各項において述べたが, それらを通じて一般にいえることは次のごとくである. すなわち, 冬は夏にくらべて一般に変化の程度が少い. この季節差は, とくに, NaCl 増加あるいは浸透圧増加の影響において著しいが, この場合の冬の緊張変化の曲線は夏の曲線の X 軸がひきのばされたものと考えるこ

とができる。

ACh 感受性の季節差については、冬に高く、夏に低いといわれているが¹⁷⁾¹⁸⁾、著者の実験では大きな差はない。しかし、冬においては潜時が夏にくらべて大きく、収縮期間は長い。自働性の相動収縮の収縮期間にも同様の傾向が認められる。

Ⅲ. 考 察

Carlson and Luckhardt⁷⁾ はカメにおける肺の自働収縮は動物が最良の条件にあるときのみにもみられると述べているが、Brecht⁸⁾⁹⁾ ら、土屋、小林ら⁴⁾⁵⁾ はカエルあるいはヒキガエルの肺の自働収縮は生体内にある場合や血液で灌流した場合には出にくく、生体外で Ringer 液を使用したときにしやすいと述べている。そして、カエル肺に対する Ringer 液の非生理性が云々されている⁹⁾¹⁰⁾。この実験の目的は、はじめに述べたように、自働収縮の発現を抑制する手段を見出すことにあった。そして、Ringer 液の組成を変化させることによって、自働収縮を抑制することができたが、それは、同時におこる緊張変化による二次的な抑制ではないこと、アセチルコリンに対する肺筋の感受性の変化と自働収縮の消長とは必ずしも並行しないことなどを知った。

細胞膜を横ぎる各種イオンの移動が細胞の興奮過程に一義的な重要性をもっていることはいうまでもない。平滑筋についても、静止膜電位は主に外液の K^+ 濃度に、活動電位は主に外液の Na^+ 濃度に関係していること、また張力や緊張の増大は静止膜電位を減少させることなどが知られている¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。一方平滑筋は形態的、機能的に著しい多様性をしめすことも知られている¹¹⁾¹²⁾。そこで著者は以下に、外液環境の変化の肺平滑筋に対する影響についての巨視的実験の成績について考察してみたい。

平滑筋器官を Ringer 液に浸すと一般に著しい緊張性収縮を来す事は古くから Ringer 緊張あるいは Ringer 拘縮として知られている。ヒキガエルの肺も例外ではなく、Ringer 液に

浸したり、それで灌流したりすると顕著な拘縮を来す。この拘縮は当然外液のイオン環境その他が変ったことによると考えられるが、一旦起った拘縮は著者の実験の範囲内の環境の変化ではこれをもとにもどすことはできなかった。

外液の滲透圧をブドウ糖添加によって高めていくと、夏では緊張は一旦低下し、後かえって増加を示すが、冬では緊張の上昇はみられない (Fig. 2, A)。この緊張変化は滲透圧を NaCl 添加によって高めると更に顕著になる (Fig. 3, A)。Fig. 3, A と Fig. 2, A における条件の差異は NaCl 濃度増加の有無である。したがって、両者の差 (Fig. 8 の太い曲線) は NaCl 単独の増加の影響そのものではないにしても、少なくとも、その傾向を示していると思われる。すなわち、NaCl の増加は緊張を低下させるが、その程度が強くなるとかえって高める傾向がある。そして、Fig. 2 が示すように、夏における滲透圧増加の影響が NaCl 濃度が低くなっていくにつれて冬のそれに近似してくることは、夏における滲透圧増加による二相性の緊張変化に対しては NaCl の存在が必要であることを示唆する。冬においては NaCl の効果は正常の約3倍の滲透圧まではわずかの緊張低下のみであり、滲透圧変化に対する緊張変化もこれとほぼ同様である。これらのことから著者は、滲透圧上昇にとりなう緊張変化は漸進的な緊張低下であり、それが NaCl の存在のもとでは、NaCl 濃度の上昇と同様な効果を併せ現わすと考えたい。従って、NaCl の存在する場合の滲透圧上昇の影響としては、その固有の効果に見掛けの NaCl 濃度上昇の影響が重なってあらわれてくる。

Vogt¹⁴⁾ は蔗糖あるいは乳糖添加によるウサギの小腸縦走筋の緊張増加の様相が NaCl 増加によるものと極めて似ていと述べていることは、著者の成績と考え合せて興味深い。Vogt はさらに、この効果はニコチンによって抑制されるから、滲透圧や NaCl 増加の効果は Auerbach 叢の刺激によるものであると述べているが、著者はこれについては言及できない。NaCl の著しい増加による緊張の上昇は Singh (カエルの

胃)¹⁵⁾, Holman (モルモットの結腸紐)¹⁶⁾らもみているが, Singh は NaCl 増加による緊張増加が浸透圧増加による緊張増加が浸透圧増加によって中和されると述べているのは著者と一致しない。また, Holman は NaCl の緊張増加は15分以上浸しておくで減少しはじめるというが, 著者は20分以上浸しつづけても緊張の低下は認めなかった。Holman によると, 蔗糖による浸透圧上昇は NaCl と反対に緊張低下を来たすという。これは, NaCl または浸透圧の軽度ないし中等度増加のときにみられる緊張低下と関係があるものかも知れない。しかし, 材料の差異も充分考慮されなければならない。また, 著者は, 冬季においては高張浴によって決して緊張増加をみとめなかったが, Corsten¹⁷⁾ は冬のカエルの肺で緊張増加をみとめている。これも材料, 実験室温などの差によるものであろう。

NaCl 濃度の低下は緊張の増加を来たす。これは冬より夏に著しい。NaCl 濃度とともに浸透圧もへると, 緊張増加の程度は著しくなる (Fig. 3, B)。すなわち, NaCl 減少効果は浸透圧減少によって増強される。これは浸透圧増加の場合, その固有の効果の他に見掛けの NaCl 上昇効果を伴うという上述の推論から, 浸透圧低下が見掛けの NaCl 減少効果を併せ現わすのではなからうか。

KCl 濃度の上昇は 0.1-0.2% 位まではかなり著しい緊張の増加を来たす。これは他の平滑筋における成績と一致する¹¹⁾¹²⁾。

さきに, NaCl 増加単独の影響を Fig. 3, A の曲線と Fig. 2, A の曲線との差の曲線 (Fig. 8 の NaCl 曲線) から推定した如く, KCl 増加単独の影響が KCl, 浸透圧増加による緊張変化の曲線 (Fig. 6, B) と浸透圧のみの増加による緊張変化の曲線 (Fig. 2, A) との差 (Fig. 8 の KCl 曲線) から推定できるとすると, KCl 増加の効果は極端に高濃度でない限り, NaCl 濃度の上昇の効果と対照的あるいは対称的であり (Fig. 8), NaCl 濃度減少と同傾向である。Fig. 8 に示す如く, KCl, NaCl の効果の対称性が, それらの増加の原濃度に対する比についてみら

れるのではなくて, それらの増加量そのものについてみられるということの理由は明らかでないが, NaCl 効果と KCl 効果とが, とにかく, 実験操作に伴う浸透圧の変化などに無関係に対照的であることは興味深い。なお, KCl 増加に対する緊張変化の曲線の形が, NaCl 減少を伴った場合と浸透圧増加を伴った場合とで異なるのは, 前者では NaCl 減少の効果が, 後者では浸透圧上昇の効果が重なっているためと考える。

自働収縮は上述のすべての液性環境の変化による緊張変化の極大点あるいは極小点附近あるいはそれに到る前において消失する。浴液組成の変化の比較的少ない範囲では, すでに他の報告で述べたように⁴⁾⁵⁾, 自働収縮はたしかに緊張と密接に関係している。しかし, 緊張の極大点あるいは極小点をこえた液性環境の変化による緊張変化は, その方向, 程度の如何にかかわらず自働収縮を誘起させない。このときの緊張変化は, 著しい外液環境の変化にもかかわらず可逆性であるから, 筋の著しい傷害を意味するものではない。してみると, 自働収縮の出現, 消失が筋緊張のみに関係しているのではないといえよう。

0.2% の KCl 濃度附近でみられるきわめて高頻度 (約 4/min) の自働収縮は他の条件では決してみられない特異なものであるが, その原因については現在のところ不明といわざるを得ない。

Corsten¹⁷⁾, Brecht¹⁸⁾ は, 肺筋の ACh 感受性は外液の塩類濃度の変化によってほとんど影響されないと述べている。著者の実験では季節を問わず ACh 収縮は緊張の低いときに大きく, 高いときに小さい傾向がある。そして, 緊張の高いときには収縮につづいて弛緩相が現われることが少なく, まれには, 収縮がほとんどみられず弛緩のみが認められることもある。緊張変化に伴うこのような ACh 感受性の変化は液性環境の変化による緊張変化の極大点と極小点の間の範囲においてのみ認められ, それより極端な環境においては認められない。従来報告

にみられる ACh 感受性の季節差は、後述の如く、同一組成の浴液中において示す肺筋の緊張が季節によって異なることに、その本質が潜んでいることを推定させる。

冬季には標準 Ringer 液中では自働収縮を示さない標本が多いが、この標本においても NaCl あるいは滲透圧を減少させることによって、自働収縮を誘起させることができること、夏季には標準 Ringer 液中でほとんど常に自働収縮を示し、外液の滲透圧（あるいは NaCl）を増加させることによって消失させること、血液灌流では自働収縮が季節を問わず出現しにくいこと⁸⁾⁹⁾、また、両生類の血液性状は季節差をしめすことなどを考え合せると、夏季ではわれわれの用いた標準 Ringer 液の性状が血液より低張性であり、冬では等張性に近かったために自働収縮の出現頻度に季節差が生じたのではなからうか。自働収縮の出現頻度、収縮の周期およびそれらの季節差などに関するこれまでの報告¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾にみられる少なからぬ差異は各報告者の実験条件、なかんずく肺の伸展負荷の差、Ringer 液の性状の差にもとづくものである。

IV. 結 論

外液環境の NaCl, KCl, 滲透圧の変化によるヒキガエル摘出肺の緊張の変化を調べた。

NaCl 濃度増加は冬では常に緊張低下を来たすが、夏において2倍以上の濃度ではかえって緊張の上昇を来たす。NaCl 減少は緊張の上昇を来たす。

滲透圧の上昇の本来の作用は緊張低下にあると思われるが、NaCl の存在のもとでは、それが増加したのと同様の効果を現わすものと考えられる。滲透圧低下の効果については、その上昇の効果とほぼ反対のことがいえる。

KCl 増加は緊張の上昇を来たす。それは NaCl 増加の効果と対照的である。その減少の効果はこの実験では不明である。

自働収縮の発現および ACh 感受性の維持には、外液性状がある範囲にあることが必要であ

り、この範囲は動物の体液の性状の季節変化と関連して季節的な変動を示すもののように思われる。

文 献

- 1) Kobayasi, S. and Ch. Yoda (1960) Effects of adrenaline and acetylcholine upon the smooth muscle of isolated lungs of Japanese toads. *Acta med. biol. Niigata* **8**, 241-250
- 2) Kobayasi, S. and S. Furuya (1960) Effects of histamine and curare upon the pulmonary muscle tone in isolated lungs of the Japanese toad. *Acta med. biol. Niigata* **8**, 251-259
- 3) Kobayasi, S. and K. Takahashi (1960) Über den Einfluss der Kohlensäure und des Sauerstoffs aufs Lungenmuskelpreparat der japanischen Kröte. *Acta med. biol. Niigata* **8**, in press
- 4) 土屋昭一 (1959) ヒキガエルの摘出肺にみられる自働収縮について *日本生理誌* **21**, 272-279
- 5) Kobayasi, S., S. Tsuchiya and K. Takahashi (1961) Contributions to the periodic spontaneous contractions in the lung of the Japanese toad. *Jap. J. Physiol.* in press
- 6) 竹田橋雄 (1954) 蛙肺標本に依る Acetylcholin の定量法に就いて *日本薬理誌* **41**, 291-301
- 7) Carlson, A. J. and A. B. Luckhardt (1920-1) Studies on the visceral sensory nervous system III. *Am. J. Physiol.* **54**, 261-306
- 8) Brecht, K. und E. Feyrer (1948) Zur Physiologie der Muskulatur der Froschlunge. *Pflügers Arch.* **250**, 228-242
- 9) Brecht, K. (1947) Über die Wirkung elektrischer Reizung des Vago-Sympathicus auf die glatte Muskulatur der Froschlunge und ihre Beeinflussung durch Ionen bei künstlicher Durchströmung. *Pflügers Arch.* **249**, 94-111
- 10) Luckhardt, A. B. and A. J. Carlson (1921) Studies on the visceral sensory nervous system VIII. *Am. J. Physiol.* **56**, 72-112
- 11) 後藤昌義 (1960) 平滑筋の一般生理学 内田, 内蘭編: 新生理学上巻 東京 医学書院
- 12) Prosser, C. L. (1960) Comparative physiology of muscles. in Bourne, G. H. (ed.) *The Structure and Function of Muscle*, Vol. 2., New York and London, Academic Press
- 13) Bühlbring, E. (1955) Correlation between membrane potential, spike discharge and tension in smooth muscle. *J. Physiol.* **128**, 200-221
- 14) Vogt, M. (1943) The site of action of some drugs causing stimulation of the circular coat of the rabbit's intestine. *J. Physiol.* **102**, 170-179
- 15) Singh, I. (1939) A comparison study of the effect of the interrelation of ions, drugs and electrical

- stimulation by contraction of unstriated muscle. *J. Physiol.* **96**, 367-384
- 16) Holman, M. E. (1957) The effect of changes in sodium chloride concentration on the smooth muscle of guinea-pig's taenia coli. *J. Physiol.* **136**, 569-584
- 17) Corsten, M. (1942) Die jahreszeitlichen Änderungen der Acetylcholinempfindlichkeit der Froschlunge, ihre Beeinflussung und ihre Ursache. *Pflügers Arch.* **245**, 198-209
- 18) Brecht, K. (1943) Über die Wirkung des Acetylcholins auf die Froschlunge, ihre Beeinflussung und ihre theoretischen Grundlagen. *Pflügers Arch.* **246**, 553-576
- 19) Dijkstra, C. et A. K. M. Noyons (1939) Recherches sur sensibilité à l'acétylcholine des muscles lisses du poumon de la granouille. *Arch. internat. Physiol.* **49**, 257-272
- 20) Verzsár, F. (1940) Untersuchungen über die Funktion der glatten Muskulatur der Lunge. *Helv. med. Acta* **7**, (Suppl. 5), 257-272
- 21) Brecht, K. und K. Fraessle (1944) Über die Wirkung elektrischer Reizung des Vago-Sympathicus auf die Froschlunge. *Pflügers Arch.* **247**, 649-659
- 22) Grünberg, H., P. Reicherz und J. Mussa (1958) Über die Spontankontraktionen der isolierten Froschlunge und ihre Aktionspotenziale. *Pflügers Arch.* **267**, 446-452

肝細胞リボ核蛋白粒子 (Ribosome) およびそのリボ核酸

成分の電子顕微鏡的研究 612.014.2

(第1報) 肝細胞リボ核蛋白粒子の電子顕微鏡的研究

Electron microscopic observations of the ribonucleoprotein particles (ribosomes) isolated from liver cell and of their RNA component.

I. An electron microscopic study on the ribonucleoprotein particles of liver cells

清水 英子 (SHIMIZU-Hideko)*

Ribonucleoprotein particles (ribosomes) were prepared by Hall and Doty's method from calf liver and observed electron microscopically.

1. The isolated ribosomes contained 35-40% of RNA and were almost homogeneous in an electrophoretic field.

2. Rat liver cell or isolated ribosomes were fixed with OsO₄, embedded in methacrylate and ultrathin sectioned to be observed by an electron microscope. They were spherical molecules, 70-150 Å in diameter, and had a light core and dense ring around it. Molecular structure of the ribosomes was discussed in relation with such electron microscopic findings.

3. The sprayed and shadowed ribosomes were also spherical and their average diameter was about 210 Å. Sometimes oval particles (350-400 Å in length) were observed which probably correspond to the 110-120 s component (dimer) of the ribosomes.

I. 序 論

肝細胞リボ核蛋白粒子, すなわち ribosome は1954年 Petermann ら¹⁾によって肝細胞上清の超遠心ならびに電気泳動分析からその存在が予言されたが, 1955年になって, Littlefieldら²⁾は, 胆汁酸法を用い, この粒子を単離することに成功した. 同時に彼等は C¹⁴-アミノ酸の ribosome への転入速度が非常に大きい事を証明し, 蛋白質合成, ことにペプチド結合の生成はこの粒子の上で起るであろうと予想した. この推定は Zamecnik 一派らはじめ多数の研究によって裏付けられ, 今日蛋白質合成の中間過程における ribosome の重要性を疑う者はない.

一方 Palade らは超薄切片法を用い, 細胞の微細構造について広範な研究を行い, 所謂

endoplasmic reticulum あるいは intracytoplasmic double membrane 等の名称で呼ばれる超顕微鏡的構造を記載し, 特にこれら構造物と附随して 100-200 Å の electron dense な顆粒が存在することを認め, この粒子が胞体の好塩基性と平行することを見出した. Palade, Siekevitz³⁾ならびに田代, 小倉ら⁴⁾は RNase, trypsin などの酵素消化法を行い, この粒子すなわち, Palade granule が, リボ核酸と蛋白質から成ること, 即リボ核蛋白粒子であることを明らかにした. 今日この粒子は ribosome と呼ばれ, 動物細胞のみならず, 植物細胞, 細菌, ウイルス等に遍在的に存在する極めて一般的な粒子であることが明らかにせられて居る.

Ribosome の分子量, 均一性, その他の物理化学的性質については Schachmann⁵⁾あるいは, Petermann 以来可なり多数の研究があり, 当教室においても一連の研究が報告せられている.

しかし乍ら電子顕微鏡的観察は Littlefield ら²⁾の初期の研究, 当教室の報告⁶⁾, その他 2-3⁷⁾

* 京都大学医学部生理学教室

Dept. of Physiol., Kyoto Univ. School of Med.

[昭和36年2月7日受付]

を除き、比較的報告が少い。さらに当教室における研究も、ribosome の分離に Littlefield らの方法を用い、又蒸着粒子の比較的粗い Crshadowing 法が用いられているために、再検討を加える必要にせまられている。そこで著者は ribosome の分離に Doty らの方法⁸⁾を改良して用い、又最近 Hall ら⁹⁾¹⁰⁾によって考案せられた方法に従い、ribosome について電子顕微鏡的観察を行ったので報告する。

II. 実験方法

1. 実験動物

生後3-7日程度の健康な仔牛の肝臓を用いた。肝臓は仔牛の屠殺後直ちに剔出、厚さ約1cmの薄片となし、ドライアイスで急速に凍結せしめ、 -30°C に保存、使用直前に 4°C で融解して用いた。通常肝臓は剔出後2-3時間以内に用いた。

2. Ribosome の分離

Ribosome の分離には従来 Littlefield の方法²⁾を用いて来たが、本法で分離された ribosome は抽出操作中に degradation がおこり、分子量の低下がみとめられると云う¹¹⁾。そこで今回は Doty ら⁸⁾の方法を多少変更して用いた。

先づ肝臓200gを細切し、360mlの0.25M蔗糖を加え、Waring blender 中にて homogenize (4分間、最大速度の1/2-3/4)。次でhomogenate を14,000g 10分間遠心、沈渣を除く(久保田製冷凍遠心機使用)。上清をさらに79,000gで120分間遠心(日立40p分離用超遠心機使用)、ペレットを集め、ミクロソーム分割とする。ミクロソーム分割を、約300mlの蒸溜水で再分散(Waring blender で低速回転で分散、これに0.5N NH_4OH を滴々加え、pHを8.0とする。予めNa deoxycholate (ミノファーゲン特級使用)を、0.5%になる様に、0.01M トリス緩衝液(pH 8.0)に溶しておき、これを約40ml加える。しばらく攪拌し、次で79,000gで180分間遠心、上清を静かにピペットで除き、沈渣を粗 ribosome として回収した。通常この粗 ribosome を0.02M $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0

の緩衝液にとかし、10,000g 20分間遠心、上清を精製 ribosome として用いた。

以上の全操作は 5°C 以下の低温で行い、遠心操作以外は全て $4\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ の低温恒温室を使用した。

3. 化学分析

精製 ribosome 溶液の1mlに1N 過塩素酸1mlを加え、10-20分間遠心、沈渣を0.5N 過塩素酸で2回ほど洗い得た沈渣については Littlefield ら²⁾の方法に従い、RNA および蛋白質の分析を行った。

但しRNAは日立EPU-2A型分光光度計で260 μ における吸収を測定し、RNAの吸光係数を34.2/mg \cdot ml \cdot cmとして濃度を計算した。

又蛋白質はLowryら¹²⁾の方法に準じ、Folin試薬で呈色反応を行い、750 μ における吸光係数を測定した。蛋白質の算出には ribosome の蛋白部分の一定量を acetone と ether でよく洗い、 110°C 、5時間乾燥後、乾燥重量を測定して作製した換算曲線を用いた。

4. 物理化学的性質

抽出した ribosome については電気泳動分析を行ったが方法の詳細は次報で述べる。超遠心分析は機械の都合で行い得なかった。

5. Ribosome の超薄切片像の観察

正常ラッテ肝小片を1% OsO_4 (0.25M sucrose を含む aceto-veronal 緩衝液使用)で固定、常法に従い、メタアクリル樹脂に包埋、超薄切片を作製し、特に Palade granule, 即、ribosome の多数認められる部分について観察を行った。

又精製した ribosome あるいはその中間過程にある粗製 ribosome を超遠心沈澱せしめることによって得たペレットをそのまま1% OsO_4 で固定、同様超薄切片を作製した。ミクロトームとして、日本ミクロトーム製、あるいは日本電子光学 JUM-5型を使用した。

6. Ribosome の真空蒸着法による試料作製

現在生体高分子観察用真空蒸着法として最も優れた Hall の方法⁹⁾¹⁰⁾を一部変更して用いた。

先づ ribosome は 0.002-0.005% になる様に pH 7.0 の緩衝液で稀釈した。緩衝液としては揮発性であり、しかも乾燥と共に pH 値の変動の少ない炭酸アンモン-醋酸アンモン混合緩衝液 (1:1) を 1% 溶液として用いた。ribosome の形態には pH やイオン強度の影響が大きいと推定されるが、凍結乾燥法を用いても、イオン強度を一定に保ったままで試料を作製することは不可能であるから、今回は、溶媒条件についての吟味は行わなかった。

尚必要に応じ、平均直径 880 Å の Dow latex (polystyrene latex) を 0.001% 程度になる様に混入し、internal standard とした。

緩衝液で稀釈した ribosome は除塵の目的で、10,000 g 30-60分間程度遠心、1/100量の 0.1% polystyrene latex を加え、よく振盪し均一に分散せしめて用いた。

Spraying には vaponefrin を用い、約 1 気圧の圧力差で内容約 2 l の円柱型硝子容器中へ spray した。その際 spraying の直前にマイカ板を剥離し、この上に collodion の薄膜をはり (0.5% collodion 使用)、噴霧によって作られた microdroplet を受ける様にした。1-2 分放置後マイカ板を取出し、急速に乾燥せしめ、直ちに日立真空蒸着装置により、蒸着操作を行った。即 0.3 mm ϕ Pt-Pd (6:4) を 5:1 の角度から蒸着、さらに直角方向から SiO を蒸着し、SiO 膜を作った。蒸着終了後、膜に基盤目を入れ、蒸溜水に浮かせ、mesh にすくい、検顕した。

尚 Hall の原法⁹⁾¹⁰⁾ では、マイカを collodion で coat することなく、直接 spraying を行い、Pt 蒸着後 SiO 蒸着を行っているが、この方法

では屢々試料のマイカ面からの剥離が困難となった。尚 SiO の代りに carbon 膜を使用することは可能であるが、本研究では用いて居らない。

7. 電子顕微鏡的観察

電子顕微鏡は日立 HU-10 型を用い、直接倍率 10,000-20,000 倍で撮影した。撮影には同一視野を少しづつ焦点をずらせて 4-6 枚撮影し、その中から最も正焦点に近いと思われる写真について解析を行った。

III. 実験成績及び考按

A. Ribosome の組成及び物理化学的性質

Ribosome の RNA 含量は抽出例によって多少の変動は認められたが、常に 35-40% の RNA 含量を示した。

第 1 図にこの ribosome の電気泳動図をしめす。即電気泳動的にはほぼ均一であるが、尚少量の易動度の小さい成分 (Petermann¹¹⁾ の T 成分、あるいは田代¹³⁾ の component 3) の存在が認められる。主成分の 0°C における易動度は上昇、下降脚側で夫々 -9.4 ± 0.8 及び $-8.2 \pm 0.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$ であった。

尚機械の都合で超速心分析は行って居らないが、Doty⁸⁾ とほぼ同様の抽出法を用い、精製後直ちに使用したので、この ribosome も 70-80 s 成分を主成分とするものと思われる。

B. Ribosome の超薄切片像

多数のラッセ肝細胞超薄切片を検顕し、この内から、特に Palade 顆粒の多数認められるものについて解析を行った。

第 2 図にその 1 例を示す。本例は endoplasmic reticulum が切線方向に切断されたものと思われ、多数の Palade 顆粒をみとめる。これらの顆粒は、Palade³⁾ あるいは田代⁴⁾ の研究から大部分が ribosome であると考えられる。形は正円形-楕円形で、時に連珠状、あるいは cluster 状のものも認める。

第 3 図には精製 ribosome ペレットの超薄切片像を示す。この場合の電子

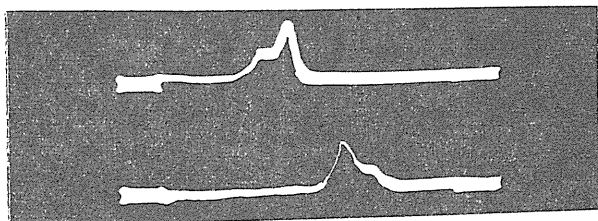


Fig. 1.

Electrophoretic patterns of the ribosome solution. The upper and the lower pattern represents ascending and descending boundary respectively.

顕微鏡的所見も、第2図とほぼ同様で、多数の正円形-楕円形の分子を認める。

第2図、第3図とも、粒子の直径は70-150 Å の範囲にあるものが多い。この値は、次の真空蒸着法で得られた粒子径よりも小さいが、これは超薄切片法では、粒子が切断面にあると、実際よりも小さく計測される可能性があるからであるろう。又形についても球形分子でない場合には切断方向によって種々の形態をしめしうる。但以上の結果から、ribosomeが球形分子に近く、且大きさは150 Åあるいは少し大きい程度と云うことは推定しうる。

次に注目すべき事実は ribosome の切片像には、中央が明るくすけて見え、周辺部が electron dense であるものが多いことであろう。中央の明るい層の幅は electron dense な層の幅とほぼ等しい。

Palade顆粒がこの様な所見を示す点については先に田代ら⁶⁾が指摘したところであるが、本法で分離した ribosome についても、ほぼ同様の構造が観察された。

以上の ring structure の解釈は非常に困難であるが、次の様な可能性が考えられる。

1) ring structure が電子光学的な artefact である可能性。これは電子線の所謂フリッジ効果によって、均一な円柱状物体でも、焦点の合せかたによって ring structure をとりうる。

2) ring structure が固定による artefact である可能性。OsO₄ 固定による超薄切片像には Os 自身の電子線散乱能の寄与が可なり大きいものと推定せられる。今 OsO₄ が球状高分子の表面でのみ反応し、分子の内部に侵入し得ないと仮定すれば、OsO₄ で固定された ribosome の超薄切片像は ring structure を示すことになる。

3) 最後に ribosome そのものが、特定の内

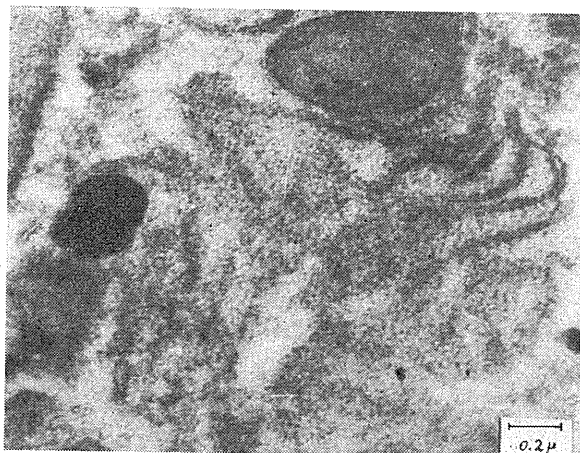


Fig. 2.

Electron micrograph of a normal rat liver cell. Note that in the matrix there are numerous ribonucleoprotein particles.

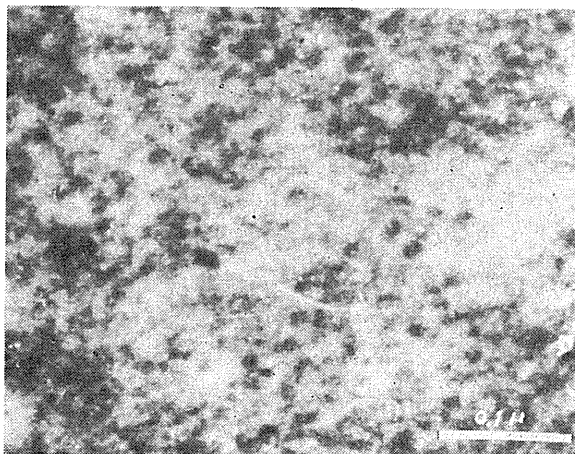


Fig. 3.

Electron micrograph of the purified ribonucleoprotein particles.

部構造をもっており、そのために ring structure が現われたと云う可能性がある。

現在までに内部構造の判明している核蛋白質、例えば tobacco mosaic virus¹⁴⁾, turnip yellow mosaic virus¹⁵⁾, T₂ phage¹⁶⁾などのウイルス核蛋白質は何れも核酸が分子の中央部にあって、蛋白質がこれを包んでいる所謂 masked typeの核蛋白質として存在する。又 chromosome の DNA-protein についても Ris¹⁷⁾によって同様の推定がなされている。しかるに ribosome について現在までに種々検討を加えた結果では

むしろ逆で、相当部分の RNA が分子表面に存在するように思われる。事実 RNase によってもこわれず、又 RNase 消化後蛋白部分と共に沈澱する RNA 分割も存在する¹⁸⁾。従って現在のところ、ribosome には subunit があって、分子表面に存在するリボ核蛋白分子と、core を作っている核蛋白分子との複合体でないかと考えられ、Siekevitz ら⁹⁾も、RNA の存在様式には異ったものがあると云う考に賛意を表しているが、ribosome の内部構造の問題は未だ暗中模索の状態にある。

尙以上の問題と関連して、最近 Huxley,

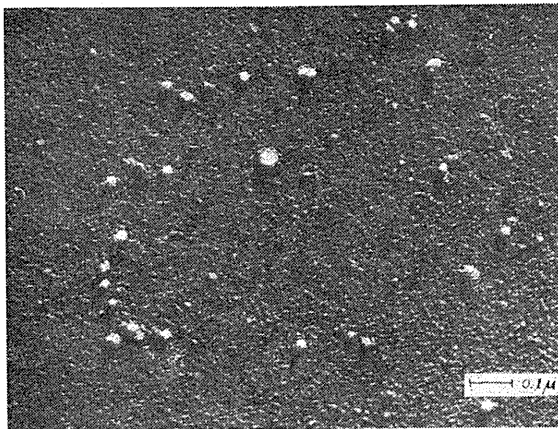


Fig. 4.
Electron micrograph of the sprayed and shadowed ribonucleoprotein particles (I).

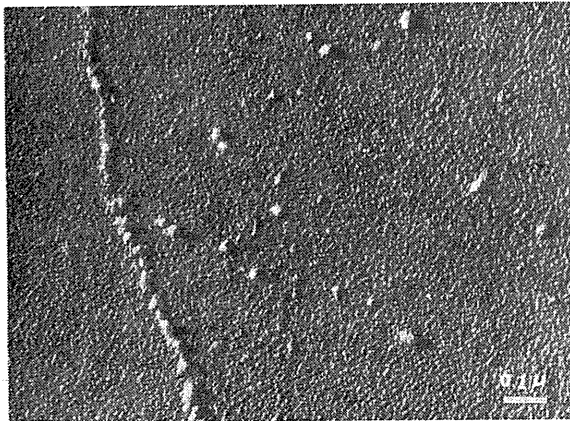


Fig. 5.
Electron micrograph of the sprayed and shadowed ribonucleoprotein particles (II).

Zubay ら²⁰⁾は negative staining を用いて、ribosome は 70 s が基本単位で、70 s は 30 s と 50 s の subunit から成り、低 Mg⁺⁺ 環境では 70 s は 50 s, 30 s の両成分に解離し、又 100 s 成分は 70 s 成分の dimer であることを明らかにしたが、現在の超薄切片像でこのような subunit の存在を区別することは不可能であった。この問題については、更に高分解能の超薄切片写真を用いて再検討したいと考えている。

C. 真空蒸着法による ribosome の電子顕微鏡像

第 4, 5 図に spraying-shadowing 法によって得られた ribosome 分子の代表的な電子顕微鏡像を示す。

これらの像から ribosome 分子は少数の例外を除き、大部分が球形分子であることが推定される。ribosome が球形分子であることは、1) 超薄切片法で観察される Palade 顆粒が球形であること、2) 超遠心分析での沈降常数の濃度依存性が比較的少いことから裏付けられ、Hall ら⁹⁾¹⁰⁾の方法に準じて行った本法でも球形分子であることが確かめられた。

次に蒸着方向と直角方向において粒子の直径を計測 (この方向では蒸着膜の厚さを無視しても大きな誤差を生じない)、これを第 6 図にヒストグラムとしてしめす。これから粒子の直径は平均 210 Å と計算された。この粒子は超遠心分析での 70-80 s 成分と対応するものと考えられる。又 shadow の長さから計算される分子の高さは直径の 70-75% であった。

尙 ribosome 分子の中には第 4, 5 図にも見られるように、双球形あるいは楕円形の分子も観察せられ、このような分子の長径は 350-400 Å に達する。これらは超遠心分析での 100-110 s 成分に相当し、ribosome の dimer でないかと推定されるが、spray された microdroplet が乾燥する際に生じた artefact である可能性も否定出来ない。

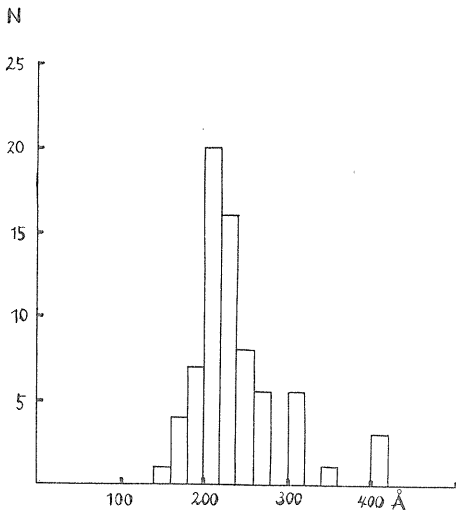


Fig. 6.

Distribution of the particle diameter of the ribonucleoprotein particles.

尙第5図の左端には microdroplet の辺縁部を示し、droplet の周辺部に ribosome が吸着され、1列に配列している状態がわかる。

ribosome の内部構造については、先に問題点を指摘しておいたが、本法による著者の観察では dimer に相当すると思われる粒子を指摘しえたのみである。勿論第4, 5図でも、200 Å よりずっと小さい、100 Å 以下の subunit と思われる粒子の存在を認めうる。しかし、これらの粒子が試料作製に伴う artefact であるのか、subunit であるのかは、現在の段階では結論出来ない。実験方法の項でも述べた通り、今回はマイカの新鮮な剝離面に先づ collodion の薄膜を作り、その上に試料を spray したが、そのため collodion 膜自身の不均一性をバックグラウンドに現わす結果となった。微細構造の観察には従って collodion を使用せぬ方がよさそうので、今後は carbon 蒸着膜を用いて再検討を加えてみたい。

IV. 結 論

仔牛肝細胞から ribosome を Hall, Doty の方法に準じて精製し、超薄切片法ならびに、Hall の方法に準じ、真空蒸着法により、電子

顕微鏡的に観察した。

1. この ribosome の RNA 含量は 35-40% であり、電気泳動的にほぼ均一である。

2. 超薄切片法で観察した ribosome は球形分子で、その直径は 70-150 Å であった。粒子の多くのものは所謂 ring structure を示し、粒子の中央部は明るく、周辺部は electron dense であった。この様な像と、ribosome の構造との関係について論じた。

3. 真空蒸着法によって観察した ribosome も超薄切片像と同様に球形分子で、その直径は平均 210 Å、大きさは比較的均一である。時には 350-400 Å の双球形乃至楕円形の粒子をも認めることが出来、恐らく 110-120 s 成分に相当する dimer であると推定される。

擱筆にあたり、終始熱心に御指導下さった井上教授ならびに御援助を得た田代講師に深謝します。又電顕撮影には京大病院中央検査室電顕室の御協力を得たので感謝します。

文 献

- Petermann, M. L., Hamilton, M. G. & Mizen, N. A. (1954) *Canc. Res.* **14**, 360
- Littlefield, J. W., Keller, E. B., Gross, J. & Zamecnik, P. C. (1955) *J. Biol. Chem.* **217**, 111
- Palade, G. E. & Siekevitz, P. (1956) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 171
- Tashiro, Y. & Ogura, M. (1957) *Acta Schola Med. Univ. Kioto.* **34**, 267
- Schachmann, H. K., Pardee, A. B. & Steiner, R. Y. (1952) *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 245
- Tashiro, Y., Sato, A. & Furuta, Y. (1957) *Cytologia*, **22**, 136
- Bock, R. M. (1958) *Microsomal Particles and Protein Synthesis*, ed by R. B. Roberts, P. 1, Pergmon Press
- Hall, B. D. & Doty, P. (1959) *J. Mol. Biol.* **1**, 111
- Hall, C. E. (1955) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 625
- Hall, C. E. & Doty, P. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1269
- Petermann, M. L. & Hamilton, M. G. (1957) *J. Biol. Chem.* **224**, 725
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265
- Tashiro, Y. & Inouye, A. (1959) *J. Biochem.* **46**, 1243
- Hart, R. G. (1955) *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **41**, 261
- Markham, R. & Smith, J. D. (1949) *Parasitol.* **39**, 330
- Hershey, A. D. & Chase, M. (1952) *J. Gen. Physiol.* **36**, 39
- Ris, H. (1956) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, suppl. 385
- Tashiro, Y. (1958) *J. Biochem.* **45**, 803
- Siekevitz, P. & Palade, G. E. (1960) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 631
- Huxley, H. E. & Zubay, G. (1960) *J. Mol. Biol.* **2**, 10

肝細胞リボ核蛋白粒子 (Ribosome) およびそのリボ核酸

成分の電子顕微鏡的研究 612.014.2

(第2報) リボ核酸成分の電子顕微鏡的研究

Electron microscopic observations of the ribonucleoprotein particles (ribosomes) isolated from liver cell and of their RNA component.

II. An electron microscopic study on the RNA component of the ribonucleoprotein particles.

清水 英子 (SHIMIZU-Hideko)*

Highly polymerized RNA was isolated from calf liver ribosomes or microsomes, and their physicochemical and electron microscopic properties were observed.

1. This RNA was homogeneous in an electrophoretic field and its ascending and descending mobilities in phosphate-saline buffer (pH 7.0, $\mu=0.1$) at 0°C were -14 and $-13 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$ respectively.

2. The RNA was found to consist of two nearly homogeneous components having sedimentation constants of 28 s and 16 s, and its intrinsic viscosity was 0.41 g/cc. The molecular weight calculated by the Scheraga-Mandekern equation was 1.2 and 0.6×10^6 respectively.

3. The highly polymerized RNA was observed electronmicroscopically either as rod like or spherical molecules. Average molecular dimension of the former was about $1000 \times 40-50 \text{ \AA}$ and about 30 \AA in heights, and the calculated molecular weight was therefore $1.2-1.3 \times 10^6$, which is in considerably good agreement with the sedimentation-viscosity molecular weight.

4. Heating to 85°C for 15 minutes resulted in the degradation of the highly polymerized RNA. The RNA then has a sedimentation constant of about 8 s and exhibits a single, relatively narrow sedimentation peak. Electron micrograph shows that the RNA was dissociated to smaller unit, about $200-400 \text{ \AA} \times 20 \text{ \AA}$.

I. 緒 論

生体高分子の電子顕微鏡的観察は、電子顕微鏡の分解能の向上と、Shadowing法, negative staining などの試料作製法の進歩により生体高分子研究の有力な手段となった。さらに最近では、単に分子の外形のみならず、その内部構造、あるいは二次構造までも研究対象となりつつある。

DNA は比較的早くからこの様な研究の対象となった生体高分子の1つであって、Hallら¹⁾²⁾によって電子顕微鏡で観察せられたDNA分子

の大きさ、形は、光散乱、超遠心、粘度等の測定から推定される値とよく一致すると云う。しかし乍ら、RNA についてはウイルス RNA を除き、ほとんど研究がなされて居らない現状である。

RNA は細胞内で、その一部が分子量数万程度の S-RNA として存在するが、大部分は蛋白質と結合しリボ核蛋白粒子即、ribosome として存在し、蛋白質生合成の中間過程で重要な役割をはたしているものと考えられて居る。著者³⁾は前報で、仔牛肝細胞から抽出した ribosome について電子顕微鏡的観察を行い、報告した。

最近 Hall 及び Doty⁴⁾ は ribosome の RNA をフェノール法で分離し、この RNA の分子量が 10^6 のオーダーに達することを見出した。蛋

* 京都大学医学部生理学教室
Dept. of Physiol., Kyoto Univ. School of Med.
〔昭和36年2月7日受付〕

白質合成の過程でアミノ酸の重合に関与しているのは、ribosomeのRNA部分であると考えられて居り、それがどの様な構造を示すかは、非常に興味ある問題である。著者は仔牛肝細胞ribosomeあるいはmicrosomeから抽出したRNAについて、物理化学的研究と平行して、電子顕微鏡的観察を行ったので、ここに報告したい。

II. 研究方法

1. 実験動物

前回³⁾と同様仔牛肝臓を抽出材料として選んだ。

2. 高分子RNAの調整

ほぼGierer及びSchrammの方法⁵⁾に準じ、フェノール法によりRNAを抽出した。精製したribosomeは、ほぼ0.5%になる様に0.02 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 緩衝液にとかして用いた。この溶液にほぼ等量の水飽和フェノールを加え、振盪機を用い、4°Cの低温室中で約30分間振盪抽出、10,000 gで約10分間遠心する。上層の水相をピペットにてとり、フェノール相に等量の0.02 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7.0の緩衝液を加え、もう一度振盪抽出する。抽出液を合わせ、これに水飽和フェノールを加え、3-4回洗う。この操作中に蛋白質はほとんど除かれる。尚フェノールは特級フェノールを使用直前に再蒸溜して用いた。

次にこの抽出液をエーテルで5-6回よく洗い、完全にフェノールを除いた後、窒素ガスを通じ、エーテルを気化せしめる。その後この液に食塩を2 Mになる様に加え、一昼夜0°Cに放置した。雲絮状に析出したRNAを低速で遠沈し、沈澱に0.02 M K-phosphate (pH 7.0)をRNA濃度が約1%になる様に加え、テフロンホモジェナイザーで軽く均一化し、一昼夜0°Cで、同じ緩衝液に対して透折した。透折内容液は14,000 g 30分間遠心、上清をRNA溶液として用いた。

以上の全操作は4°Cの低温恒温室で行った。尚その後の研究で、ribosomeまで精製を行わ

ず、microsomeを用いても、得られたRNAの物理化学的性質は変わらない事がわかった。そこで、多量生産の目的ではmicrosomeを抽出材料とした場合もある。

抽出したRNAを長期間保存する必要がある時にはdry-ice aceton中で急速に凍結せしめ、dry-ice中に保存した。高分子RNAの超遠心パターンは少くとも1回の凍結融解操作によっては影響をうけないことを確かめたが、ここでは他の物理化学的性質も変化しないと仮定して研究を進めた。

3. 化学分析

RNAの定量は、高分子RNAを0.02 M K-phosphate (pH 7.0)により稀釈、日立EPU-2A型分光光度計により260 m μ の吸収を測定し、RNAのこの条件における吸収係数を19.0/mg \cdot ml \cdot cm⁴⁾として濃度を計算した。

蛋白質の定量はLowryら⁶⁾の方法を用い、前回同様750 m μ の吸収係数を測定した。

4. 物理化学的性質

電子顕微鏡的研究に用いたRNAは電気泳動法、粘度測定法、紫外外部吸収法等により、その均一性、分子量その他の物理化学的性質を調べた。

電気泳動分析：RNA溶液をpH 7.0, $\mu=0.1$ のphosphate-saline緩衝液に対して一昼夜透折後、日立HTD-1型電気泳動装置を用いて4°Cで分析を行った。泳動後試料の電気伝導度を横河高周波ブリッジを用いて測定し、易動度を算出した。

超遠心分析：大阪大学蛋白質研究所所属の日立UCA-1型を用い、0.02 M K-phosphateを溶媒として分析を行った。廻転中の温度は、輻射を利用した日立ローター温度測定装置により測定、通常150°C内外で分析を行った。

粘度：250°Cにおける水の流速100-120秒のOstwald型粘度計を用い、25 \pm 0.01°Cの恒温槽中で測定した。

紫外外部吸収：日立EPU-2A型分光光度計により紫外外部吸収スペクトルをとり、又10-85°Cの恒温水を還流することにより、各温度におけ

る吸光係数の値を測定し, hyper-chromicityを求めた.

5. 電子顕微鏡的観察

ほぼ Hall の方法¹²⁾ に準じて行った. 但前報³⁾ の通り, Hallの方法をそのまま行くと, 蒸着膜を, マイカ板から剝離することに困難を感じたので, 新たに剝離したマイカ板上に0.5% collodion の薄膜をつくり, その上に RNA を spray した.

電子顕微鏡は日立HU-10型を用い, through-focus で撮影, その内から正焦点に近いと思わ

れる写真について解析を行った.

6. RNA の加熱処理と加熱処理した RNA の性質

以上4, 5の研究は ribosome, あるいは microsomal から抽出した高分子 RNA について行ったが, この高分子 RNA を 85°C 15分間, 温槽中において加熱処理し, 加熱処理したRNA について, 物理化学的性質の変化及び電子顕微鏡的観察を行った.

III. 実験成績

A. RNA の化学分析

この RNA の Lowry 法⁶⁾ から推定せられる蛋白質含量は 0.2-0.3% で常に 0.5% 以下であった. Lowry 法では Folin 試薬で呈色反応を行う関係上 RNA と結合して存在するアミノ酸も反応する. 従って, 実際の蛋白質含量は, 更に低いものと考えられる. この様な場合 Biuret 反応を行うことが望ましいが, 1% RNA 溶液では Biuret 反応は測定誤差範囲内に入った.

B. 高分子 RNA の物理化学的性質

次に ribosome あるいは microsomal から抽出した高分子 RNA の物理化学的性質について調べたので報告する.

1. 電気泳動分析

第1図にこのRNAの Tiselius 電気泳動パターンを示す. この図からも分子様に, 我々の実験条件下では RNA は勿論電気泳動的に均一であって, 蛋白に対応する様な成分は見当たらない. 向上昇, 下降脚の非対称は可なり著明であるが, 分子量 2-3 万程度の RNA では, 下降脚の平坦化はもっと著しい. 我々の条

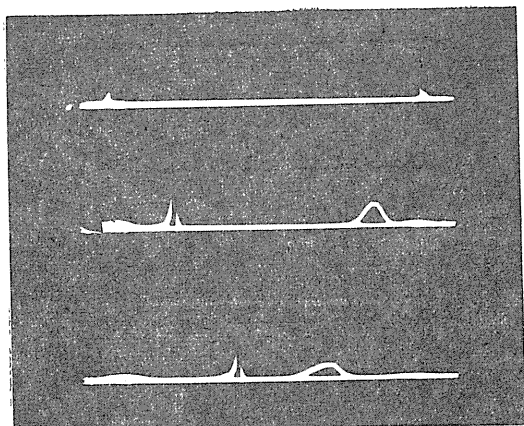


Fig. 1.

Electrophoretic patterns of the highly polymerized RNA isolated from the ribonucleoprotein particles. Photographs were taken every ten minutes intervals.

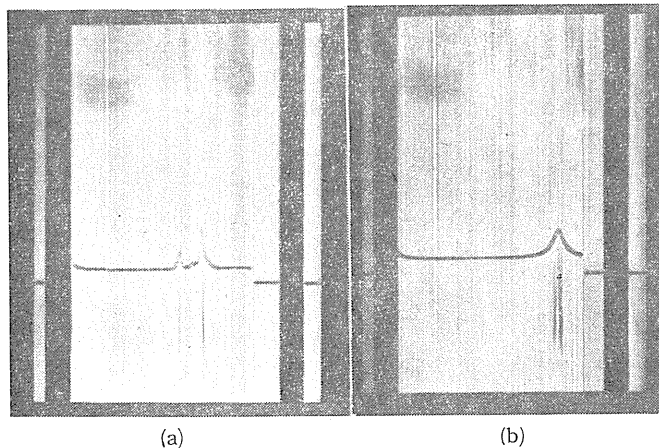


Fig. 2.

Sedimentation photographs of (a) the highly polymerized RNA and (b) the heat treated RNA (85°C, 15 minutes).

件下, 即, pH 7.0, $\mu=0.1$ の phosphate-saline 中での 0°C における易動度は上昇脚, 下降脚側で夫々 -14 及び $-13 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ であって, この値は従来報告された RNA の易動度と一致する.

2. 超遠心分析

超遠心パターンを第2図 a に示すが, この図からも, この RNA は少くとも2つの成分から成ることがわかる. 濃度0に外挿し, 且溶媒を 20°C H_2O としたときの沈降常数即 $s_{20, w}$ は夫々 28 s 及び 16 s であった (第3図参照). 尙 28 s と 16 s との間に, ほぼ中間の沈降速度を示す成分の現われることもあったが, この成分は非常に小さく, 時間と共にほとんど判別がつかなくなるので, その沈降常数の計算は行って居らない.

3. 粘度測定

高分子 RNA は 25°C では不安定であって, 次第に粘度が低下する. そこで 0°C に保存された RNA 溶液を 25°C 恒温槽中の Ostwald 粘度計にうつし, 直ちに粘度測定を開始し, Specific viscosity を時間に対しプロットし, 粘度が直線的降下を示す様になってから, 時間0に外挿し, これを RNA のこの濃度における specific viscosity とした. 固有粘度は種々の濃度の RNA 溶液を予め作製しておき, 各々の specific viscosity を求めて濃度0に外挿するか, あるいは Huggins の式⁷⁾,

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k'[\eta]^2 C \dots\dots\dots (1)$$

但 $[\eta]$: 固有粘度

η_{sp} : specific viscosity

C: RNA の濃度

k' : 常数で RNA の場合には 0.4 と仮定から計算した. RNA の場合には計算値と実測値はよい一致を示す.

高分子 RNA 5 例についての平均値は, 0.42 g/cc であって, この値は Doty ら⁴⁾ が得た 0.41 g/cc とよく似た値を示した.

4. RNA の分子量

第2図にも示した通り, 高分子 RNA は少く

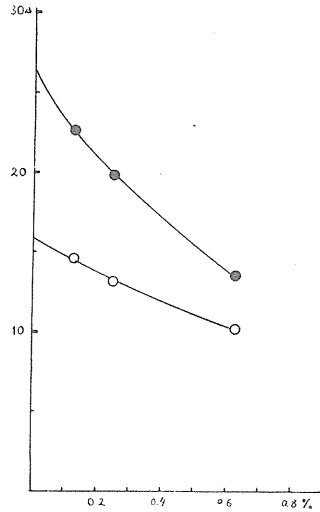


Fig. 3.

Sedimentation coefficient of highly polymerized RNA.

とも2つの成分より成り, しかも沈降常数は可なり大きい. 従ってこれら RNA の分子量を求めるためには, 28 s 成分と 16 s 成分を分離することが要求される. しかし現在のところ, 両成分を分離する適当な方法がないので両成分の摩擦的性質 (frictional properties) が対等であると仮定して, Scheraga-Mandelkern の式⁸⁾ から分子量を求めた.

$$\frac{S^{\circ}[\eta]^{1/3}}{M^{2/3}} = \beta \frac{(1 - \bar{V}\rho)}{\eta^{\circ} N} \dots\dots\dots (2)$$

但 S° : 25°C の 0.02 M K-phosphate buffer pH 7.0 中における RNA の沈降常数の濃度0への外挿値

M: RNA の分子量

\bar{V} : RNA の分比容で 0.55 と仮定

ρ : 溶媒の 25°C における密度

(実測値は 1.0046)

N : Avogadro 数

η° : 溶媒の 25°C における粘度

β : 常数で RNA の場合 2.35×10^6

計算の結果 28 s 成分の分子量は 1.2×10^6 で, この値は, Hall ら⁴⁾ の報告とよい一致を示す. 又 16 s 成分の同様に計算された分子量は 0.6×10^6 であった.

5. RNA の紫外外部吸収及び hyperchromicity

この RNA は上記 K-phosphate 緩衝液中ではその極大吸収部は $258\text{ m}\mu$ に、又、極小部は $230\text{ m}\mu$ 附近にあり、 $A_{230\text{ m}\mu}/A_{258\text{ m}\mu}$ は 0.475 程度であった。

日立 EPU-2A 型の恒温槽に、 10° - 90°C の恒温水を循環しつつ $260\text{ m}\mu$ における紫外外部吸収の読みを追跡すると、第4図に示す通り 10° - 90°C の間で20%程度の hyperchromicity が観

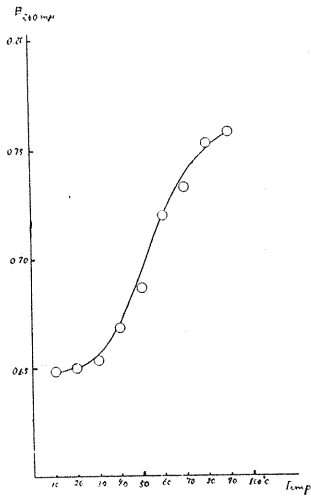


Fig. 4.

The temperature dependence of the optical density of RNA.

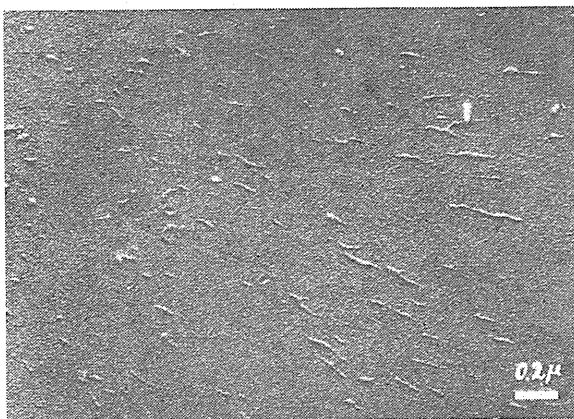


Fig. 5.

Electron micrograph of the highly polymerized RNA (low magnification) shadowed with Pt-Pd at an angle of 5:1.

察せられた。さらに 90° - 10°C に温度をもどすと、ほぼ完全に可逆的にもとの値にもどった。

C. 高分子 RNA の電子顕微鏡的観察

第5, 6, 7図に高分子 RNA の電子顕微鏡像を示す。我々の実験条件のもとで観察される RNA の電顕像の大きな特徴は、RNA 分子が可なり多様な形態をとって表われると云う点である。これは DNA 分子とはすこぶる対照的であって、第5, 6図にも示す通り、棒状の分子

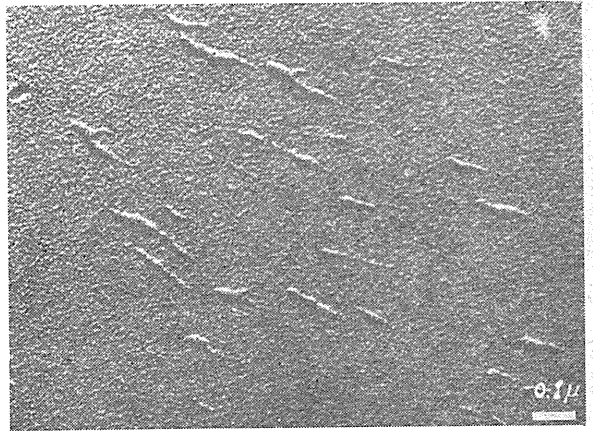


Fig. 6.

Electron micrograph of the highly polymerized RNA (high Magnification I) shadowed with Pt-Pd at an angle of 5:1.

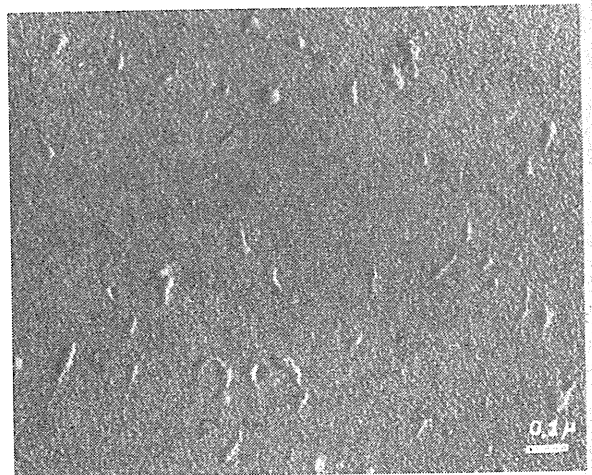


Fig. 7.

Electron micrograph of the highly polymerized RNA (high magnification II) shadowed with Pt-Pd at an angle of 5:1.

から、ほとんど球状に近い分子まで種々の形態のものが認められた。一般に *spraying* によって作られた *microdroplet* の周辺部には棒状で、中心部では球状分子に近い形態をとるものが多く、第5図でも明らかにこの傾向が認められる。その理由としては落下した *microdroplet* が膜面に拡がる際、あるいは *microdroplet* が乾き上る際に、その中心から周辺部へ、逆に周辺部から中心へ向う流れが生じ、流れに従って RNA 分子が球状—棒状に変形されたものか、あるいは RNA 分子に本来棒状のものと、球状に近いものと2種類があって、その内棒状のものが *microdroplet* の周辺部に吸着、配向を受けたのか何れかであろう。但場合によっては1つの *microdroplet* の中に、ほとんど棒状分子のみを認めることと、逆に球状分子のみを認める事とあり、*spraying* の操作そのものに伴う流動による変形である可能性もある。

先づ棒状の分子として観察される RNA 分子の電子顕微鏡像を第6図に示す。これらの像からも判る通り、同じ棒状の分子でも長さや幅に可なりの変動があることがわかる。第8図に長さの分布に関するヒストグラムを示すが112個の RNA 分子についての長さの平均値は 950 \AA であった。shadow の長さから推定される分子の高さは約 30 \AA である。分子の幅にも同様の変動があり、 $40\text{--}50 \text{ \AA}$ のものが多いが、これは蒸着粒子の厚さの推定に、相当の誤差を伴うと思われるので、信頼性に乏しい。

尙第5、6図で注目されることは、枝分れ分子が存在することである。この様な枝分れ分子は、棒状分子10ヶについて1ヶ程度の頻度で出現する様であり、もとが太くて先が矢じりの様に2本に分れ、従って2本の線維がより合って作られたと云う感じを与えるものが多かった。但この様な分子は、*spraying* の操作中に2ヶ或はそれ以上の分子が結合して出来た *artefact* で

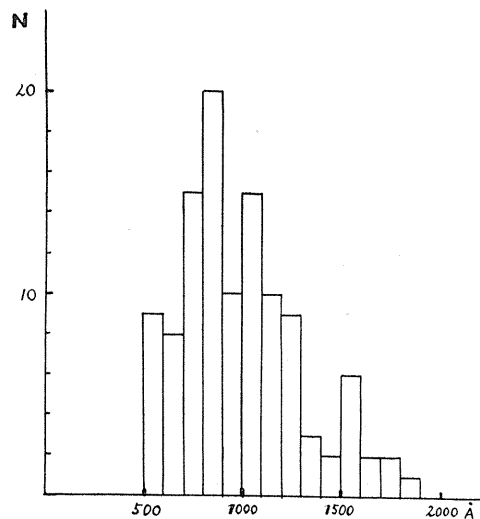


Fig. 8.
Distribution in length of the highly polymerized RNA.

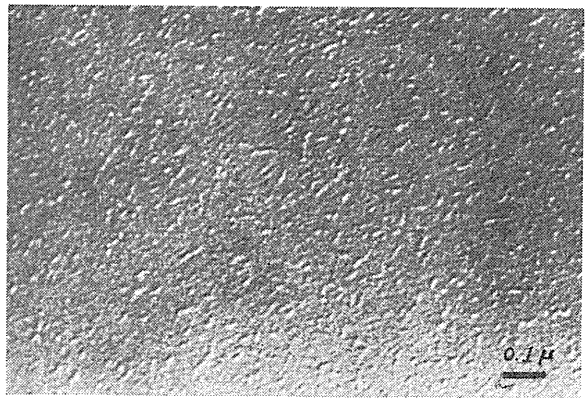


Fig. 9.
Electron micrograph of the heat degraded RNA shadowed with Pt-Pd at an angle of 5:1.

あると云う可能も否定出来ない。

次に第7図に *microdroplet* の中心部に見られることの多い、球形あるいはそれに近い分子の電子顕微鏡像を示す。この様な分子は非常に多形であり、一定の形を示さない。ほぼ正円形に近いものから、楕円形、三角形、菱形に近いものまで、種々の形をとっている。但分子の高さはほぼ 30 \AA 位である。

D. 加熱処理した RNA

高分子 RNA を 85°C 15分加熱すると20%程度の *hyperchromicity* が観察されるが (第4

図), これを常温にもどすと, ほぼ完全に hyperchromicity は消失する.

しかし沈降パターンの変化は不可逆であって, 第2図 b に示す通り, RNA は加熱により単一成分となり, 且その沈降常数 $S_{20, w}$ は 8 s に低下した.

粘度も非可逆的に変化し, 極限粘度は 0.25 となった.

従って分子量は Scheraga-Mandelkern の式から10万程度と興えられる.

従ってこの様な加熱操作に伴って RNA の電子顕微鏡像がどの様に変化するかを検討することは非常に興味深い.

第9図に見られる様に, 加熱処理により RNA 分子は明らかに長径短径共に減少し, 長さ 200-400 Å, 幅約 20 Å, 程度の棒状分子として観察される場合が多かった. 但我々の用いた方法では前述の通り, Collodion 膜によると思われる構造が back ground に出るため, 20 Å あるいはそれ以下の構造を云々することは適当と思われない. 現在この問題はカーボン蒸着膜を用いることにより, あるいは negative staining を併用することにより, 再検討中である.

IV. 考 按

Ribosome から抽出した RNA の電顕像には, 棒状と, 球状の2つの形態が認められることは先に述べた. それならば果して RNA は溶液中でどの様な形態をとっているのだろうか?.

この問題に満足な解答を与えることは, かなり困難なように思われる. RNA 分子は DNA 分子のように double helix を作らず, random に coil した1本の鎖状高分子と考えられている⁴⁾⁹⁾. 従って RNA は rigid な分子ではなく, flexible で溶媒の種々の条件によって容易に変形をうけるものと考えられるからである. spraying の操作に伴う流動, 乾燥, 脱水, 表面張力等の因子も当然 RNA 分子の変形に関係して来ると思われる.

従って RNA 分子の分子形態については, 電子顕微鏡以外の実験と比較対照することが望ま

しい. 現在迄に高分子 RNA のこの様な研究は非常に少なく, 僅かに Brown ら¹⁰⁾の光散乱の研究があるのみである. 即彼等は腹水細胞から抽出した RNA について光散乱測定を行い, 高分子 RNA は短軸 41-51 Å, 長軸 700-1100 Å, 従って軸比が 14-27 程度の棒状の分子であることを観察している (但彼等の用いた溶媒は pH 7.2, $\mu=0.1$ の phosphate-saline である). 勿論光散乱から与えられる分子の大きさは2平均値であり¹¹⁾, 従って直ちに電子顕微鏡から得られた値と対応付けることは出来ないが, 傾向としてよい一致をしめしていることは明らかであろう.

次に第2図 a の超遠心パターンが示す様に, この分子は少とも2つの成分から成る. その濃度依存性は第3図からも明らかな様に, 28 s 成分が大で, 16 s 成分は小さい. 従って 28 s 成分は軸比が大であり, 16 s 成分は小さいものと予想される. 従って1つの可能性として電子顕微鏡で観察される棒状の分子は 28 s 成分であり, 球状の分子は 16 s 成分であることも考え得る. 今 RNA 分子を直径 40-50 Å, 長さ 1000 Å の長円筒形分子とすると, 分子量は $1.2-1.3 \times 10^6$ と計算され, 28 s 成分の沈降常数粘度から計算された分子量とよい一致を示す. 今後 28 s 成分と 16 s 成分を分離し, その電子顕微鏡像を比較検討したいものと考えている.

次にこの高分子 RNA の二次構造は Doty ら⁴⁾によってかなり詳細に研究され, RNA の場合, 局所的に helical structure が存在し, これが加熱に伴って可逆的に解裂することが推定されている. 従って分子量変化と関連してその内部構造の変化を研究することは非常に興味深いが, 今回は単に分子の大きさの減少を指摘するに止める.

最後に ribosome と RNA の電子顕微鏡像を比較して気付くことは, RNA が ribosome に存在するときには, かなり compact にたたみ込まれているのではないかと云う点である. ribosome の 70-80 s 成分の分子量は 4×10^6 のオーダーで, そのうち RNA が約 40% を占める

ところから, RNA の分子量は 1.6×10^6 程度と推定され, 従って1コの ribosome には 1.2×10^6 の RNA と, 0.6×10^6 の RNA が1ケづつ存在していると考えられている¹²⁾. そのためには先づ RNA の磷酸基にもとづく負の荷電が遮蔽される必要があり, 恐らく蛋白質と結合することにより, あるいは Mg^{++} の存在によって, この遮蔽が行なわれ, RNA は非常に compact にたたみ込まれ, 結晶に近い状態をとっているのではないかと考えられる. そしてこの様な場合, アミノ酸重合の際, 特異性を決定する上に適しているのではないだろうか?.

V. 結 論

仔牛肝細胞 ribosome あるいは microsomes より高分子 RNA を抽出, その物理化学的性質をしらべ, 又 spraying-shadowing 法により, 電子顕微鏡的に観察した.

1. 高分子 RNA は電気泳動的に均一であって, pH 7.0, $\mu=0.1$ の phosphate buffer 中における易動度は, 上昇, 下降脚側で夫々 -14 , 及び $-13 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ であった.

2. 又この RNA の沈降パターンは 28 s 及び 16 s の少くとも2成分から成り, 固有粘度は 0.42 g/cc であった. Scheraga Mandelkern の式から計算される分子量は, 28 s 成分が 1.2×10^6 , 16 s 成分は 0.6×10^6 である.

3. spray-shadowing 法で高分子 RNA を観察すると, 棒状の分子と, 球状の分子をみとめた. 棒状分子は長さ平均 1000 \AA , 高さ 30 \AA 程度で分子の幅は $40-50 \text{ \AA}$ と推定される. この大きさから計算される分子量は $1.2-1.3 \times 10^6$ であ

り, 従って棒状の分子が 28 s 成分で, 球状分子が 16 s 成分でないかと推定した.

4. 高分子 RNA を 85°C で15分間程度加熱すると, RNA は均一な 8 s 成分のみとなり, 分子量は10万程度に低下する. 電子顕微鏡では, RNA は多くの場合 $20 \times 200-400 \text{ \AA}$ の分子として観察されたが, この問題竝に二次構造の変化については将来更に検討を重ねたい.

擱筆にあたり, 終始熱心に御指導, 御鞭撻下さった井上教授ならびに実験の指導を得た田代講師に深謝します. 又種々御討論下さった小林恵之助, 小倉光夫両助教授ならびに電顕撮影に御協力下さった内田貞夫氏に感謝致します. 又超遠心機は大阪大学蛋白質研究所のお世話になった. 紙上伊勢村教授, 垣内学士に深謝します.

文 献

- 1) Hall, C. E. (1955) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 625
- 2) Hall, C. E. & Doty, P. (1958) *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1269
- 3) 清水英子 (1961) *日本生理誌* **23**, 279
- 4) Hall, B. D. & Doty, P. (1960) *J. Mol. Biol.*, **1**, 111
- 5) Gierer, A. & Schramm, G. (1956) *Nature*, **177**, 702
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265
- 7) Huggins, M. L. (1942) *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4041
- 8) Scheraga, H. A. & Mandelkern, L. (1953) *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 179
- 9) Littner, U. Z. & Eisenberg, H. (1959) *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 662
- 10) Brown, R. A., Colter, J. S. & Davies, M. (1958) *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 662
- 11) Stacey, K. A. (1956) *Light-scattering in Physical Chemistry*, Butterworths Scientific Publ. London
- 12) Huxley, H. E. & Zubay, G. (1960) *J. Mol. Biol.*, **2**, 10

酸性尿生成機転に関する研究 612.463

Study on mechanism of acid production of urine in acidotic dog

藤 本 守 (FUJIMOTO-Mamoru)*

Isotonic hydrochloric acid solution being infused intravenously into 30 normal, 10 adrenalectomized, and 10 DCA administered dogs, changes of acid-base balance in the blood and urine, especially urinary acidification, were observed and a mechanism of the urinary acidification was investigated.

Results obtained are as follows :

1) Blood pH decreased gradually during the acid infusion, though changes of blood pH were not smooth, fluctuating within the pH range of 0.1 or so. The fluctuation was mainly due to increased respiratory function to keep the blood pH normal. A decrease of blood pH at the end of acid infusion into normal dogs was about 0.05 unit of pH for 1 mEq/kg B. W. of acid load. This decrease of blood pH was greater in adrenalectomized dogs than normal dogs, while it was smaller in dogs administered with DCA.

2) Urinary output of titratable acidity and ammonia increased after the acid infusion and bore an inverse correlation with the blood pH. Acid urine formation was less remarkable in adrenalectomized dogs, while it was manifested after the treatment with DCA.

3) Plasma sodium and bicarbonate ion concentrations were decreased gradually by the acid infusion, while concentrations of potassium and chloride were apparently increased. A positive correlation was found between plasma potassium concentration and urinary titratable acidity. The gradient of this regression line is lower in adrenalectomized dogs than that in normal dogs, while it is higher in dogs administered with DCA.

4) From these results, it is concluded that the mineral corticoid from the adrenal glands plays an important rôle in acid urine formation, probably by promoting an ionic exchange of H^+ with Na^+ through the cell membrane of the renal tubule. As acid urine may be produced even without adrenal gland (though to lesser extent), another factor such as an effect of K depletion from tubular cells or of increase of cellular hydrogen ion concentration should be considered in association with the rôle of mineral corticoid.

1. 緒 言

生体内に過剰の酸が生じた場合、生体はその酸塩基平衡を正常に保つ為の手段として、腎に於いては酸性尿の生成と NH_3 の分泌が行われる事は広く知られた事実である。又 Acidosis に際して腎の尿の酸性化が増強したり、尿中 NH_3 排泄が増す事も既に広く認められている。かかる酸性尿の生成機転に関しては古くは磷酸塩逆吸収説 (Montgomery and Pierce, 1937¹⁾) とか炭酸濾過説 (Sendroy, Seelig and Van Slyke²⁾, 1934) が唱えられた事があったが、今日では

Na^+-H^+ イオン交換説 (Smith 1956³⁾, Pitts 他 1945⁴⁾) が信ぜられる様になり、今日では殆んどこのイオン交換説によって酸性尿生成の基本的メカニズムの説明がなされていると言える。それによれば、腎尿管腔内に流れ来った Na^+ は、尿管細胞内の代謝性の CO_2 から由来した H^+ と交換せられて細胞内に吸収せられ、その結果、 Na^+ の体外への脱出が防がれると共に尿が酸性化すると言う。然し乍ら、Acidosisの際に何故尿の酸性化が増強するかの機転については極めて漠然としている。

一方副腎摘出動物にては尿滴定酸度が減少 (Loeb 他, 1933⁵⁾) し且つ尿中 NH_3 の排泄の減退が起る (Harris, Hartman, Rolf, and, White, 1952⁶⁾) 事がよく知られている。又人のAddison

* 京都府立医科大学第1生理学教室 (吉村寿人教授)
1st Dept. of Physiol., Kyoto Prefectural School of Med.
〔昭和36年2月18日受付〕

氏病患者に就いても同様の成績が報ぜられている (Strahl 他, 1936⁷⁾). この事実は副腎機能不全に於いては腎の Na^+-H^+ イオン交換反応が減退している事を考えさせる. 此等の事から副腎皮質ホルモンは尿細管に於ける Na^+-H^+ イオン交換反応に促進的に作用することが考えられる. 然し乍ら, この副腎皮質ホルモンの働き方についてはこれが直接に尿細管細胞に働くものか, 又は間接的な影響であるのかは充分明かでない. Pitts ら (1951)⁸⁾ はこの副腎皮質ホルモンの Na^+-H^+ イオン交換機転に対する影響は最初は直接的な刺激を与え得るものと考えていた様であるが, 其後に於いて Roberts⁹⁾ 等 (1953) の研究によって投与時には酸性尿の生成せられる事が明かになった為に, 更に実験を繰返し¹⁰⁾, 副腎皮質ホルモンの働きはむしろ間接的なものであると主張している. 即ち動物に副腎皮質ミネラルコルチコイドを投与した場合に尿細管細胞に脱失が起り, これが Na の逆吸収を促し, Bicarbonate の再吸収を促進するとなすのである. しかし一方一般細胞膜に於ける Na^+-H^+ イオン交換機序に於いて副腎皮質ホルモンが働らくという成績は 1, 2 に当らず報告されている (Wilson 1957¹¹⁾, 今村 1959¹²⁾, Sherwood Jones 1958¹³⁾). 著者は副腎皮質ホルモンが腎尿細管細胞に直接に働いても何ら不思議ではないと思ひ, この点について再検討を行い度いと考へた. 文献に於いて Pitts ら (1955)¹⁰⁾ は副腎皮質ホルモンの酸性尿に対する影響を見る為にラットを用いて約10日間の観察を行い, 副腎摘出ラットと正常ラットに対する塩化アンモン投与の影響の比較を行って結論している. しかしこれらの長期実験では血液の Acidosis と尿の酸性化との機構上の関係を詳細に追求する事は出来ぬ. そこで著者は正常犬, 副腎摘出犬, DCA 投与犬等について, 吉村, 藤本 (1959)¹⁴⁾ の作製せる循環血液用ガラス電極を用い, 血液 pH を連続測定しつつ, 動物に酸を注入し, これがどの様にして尿 pH の変化を来すに到るかを綿密に観察し, 副腎皮質ホルモンの酸性尿生成に及ぼす効果の本態を究明せんと試みた.

II. 実験方法

A) 実験計画の概要

実験動物には雑種成犬45匹 (体重 5-12 kg) を使用し, それを3群に分ち, 1) 先ずその内30匹を正常のままにて酸注入実験に使用し, 2) 10匹を副腎摘出後の酸注入実験, 3) 残りを DCA 注射実験に供した. 第1群は対照群であるが実験条件の決定の意味をもこめて, その麻酔深度, 酸注入速度, 酸注入量, 呼吸状態等の諸因子を変えた場合の血液 Acidosis と尿酸性化との関係をも分析検討する事にした. かくして第1群の観察によって明かになった一定の実験条件の元にて, 第2群の酸注入実験を施行した. かくて得られた副腎摘出犬の血液及び尿の変化を, 第1群の犬と比較検討する事により副腎皮質の尿酸性化に対する意義を検したのである. 又これを確める目的にて第3群の犬について副腎皮質ホルモンを投与した際の変化をも追究した.

以下それらの実験方法に就いて述べる.

1) 正常犬酸注入実験

動物はこれを手後, 本実験に先立ち一定期間 (1週間前後) はその食質による酸塩基平衡の乱れを調整する為に吾教室の奥村 (1958)¹⁵⁾ が行ったと同様に, 一定量の中性食を摂取せしめた. そして動物を尿採集可能なる飼育箱中にて飼育し, その間連日尿電解質の性状を観察して, 動物がほぼ食飼条件と平衡に達した事を確めた後色々の実験に使用した.

酸注入実験に際しその麻酔薬としてはチクロパン曹達 (Sodium methyl-hexabarbital) を使用した. 吉村及び著者¹⁴⁾ (1959) はさきに麻酔深度と血液 pH との関係を見て, 動物の麻酔の程度が強い程, 血液 pH が著しく低下する事を示した. よってかかる影響を除く為に本実験に際しては特に一定の状態の麻酔深度を保持せんと努力した.

酸の注入には 0.16 N 等張性塩酸を使用し, これを犬の四肢表在静脈より持続注入した. 注入量は 2-9 mEq/kg. B. W. であって, 60-300分

間に亘り、 $10-60 \mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ B. W. の速度で注入した。

さて酸注入実験に際しては、酸負荷前30分乃至1時間を対照期として血液及び尿電解質諸性状、腎クリアランス、肺呼吸状態の分析を行ってからひきつづき塩酸の持続注入を実施した。注入中は一定の時間間隔にてその期間中の尿を採集しまたその期間の中央時点で血液を採取した。そしてこれ等につき後に説明する様な諸種の測定を行った。殊にこの内でも酸注入中の血液、尿の pH 及び呼吸変化の追跡にはそれ等相互間の時間的相関の観察に特に留意した。

2) 副腎摘出犬酸注入実験

10匹の健康な雑種雄成犬を1週間一定食にて養い、正常時(対照)の連日観察を行った後、一側の副腎を摘出し、ほぼ完全に回復せるを待って(約2週間前後)他側副腎を摘出した。その後4日乃至1週間目に、手術侵襲の直接影響の少ない所で、この副腎摘出犬に酸注入実験を行った。酸注入実験の方法は前記正常犬のそれと殆んど同じである。勿論副腎摘出前後は連日観

察を継続する。

犬副腎摘出法：犬を麻酔後腹位に固定し、第12肋骨最下縁に沿って脊椎骨に近く、正中線より4-15 cm 距てたる部位を、剃毛、消毒後、肋骨走向に平行に約7 cm の皮切を行う。そして遊離肋骨の遊離端を長さ4 cm ばかり切除する。その際気胸及び出血を起さざる様注意すべきである。かくて軟部を開き、後腹膜を傷害せざる様に注意しつつ後腹膜腔に達する。ここで腎を触れるから、この腎を徐々に腹尾側に圧して腎の上極から腎柄にまたがる領域を手術野に入れる。その部を観察すると、一見して副腎静脈 V. suprarenalis が後腹壁より現れて下大静脈に注ぐのが見える(第1図参照)。この副腎静脈が下大静脈に合流する少し手前にこの副腎静脈に貫かれ且つ2葉に分かれた弾性硬の副腎がある。この堅さが特徴的であって熟練すれば、これを目標にして手術をすすめ得る。1葉の大きさは $5 \times 10 \text{ mm}$ 前後である。この器官はその表面が薄い被膜でおおわれ、これが下大静脈の外膜につらなっている。しかもそれが下大静脈と完全に密着しているから、剝離に際しては下大静脈を傷付けない様に特に注意しなければならぬ。のみならず周囲組織から副腎皮質の方への毛細血管連絡が著しいから、出血を起さぬ様に注意が肝要である。剔出には先ず最初に副腎静脈を結紮切断してから1葉宛、注意深く鈍的に周囲より剝離し、副腎を周囲組織より遊離する。そして最後に下大静脈との合流点を結紮、切断して目的を達する。この手術では動物の衰弱が激しいから、術中、術後の看護が望ましく、清潔、保温、及び余病発生防止に気を付けていなくてはならぬ。

3) DCA 投与実験

犬を連日飼育して対照期(数日間)を経過してから以後連日 DCA の大量 ($1 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$) を犬臀部筋肉内に注射する。かくして10日間連日尿の酸塩基平衡に対する DCA の効果を観察した。次にこの犬について、 0.16 N 塩酸を上記の正常犬の場合と同様にして静脈内に注入し、その影響を観察して正常犬の場合と比較した。

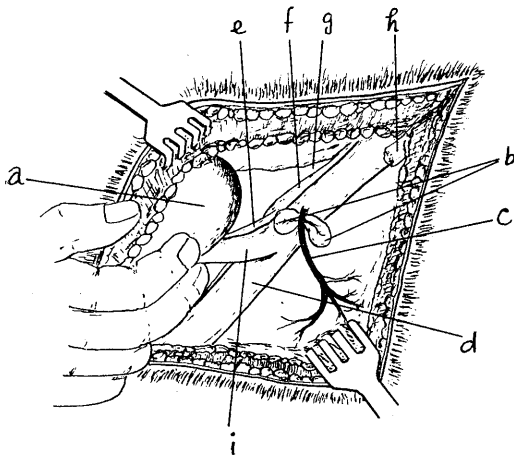


Fig. 1.

Anatomy of dog adrenal (left).

a: kidney, b: adrenal gland, c: suprarenal vein, d: inferior caval vein, e: renal artery, f: aorta, g: retroperitoneum, h: cut end of the XII rib, i: renal vein.

(Left adrenal gland is exposed by a manual depression of the kidney toward pesterolateral direction).

又両側副腎摘出後4日の犬について DCA を 1mg/kg の割合に筋注射し、約2時間後に於いて同様の酸を注入したものもある。尙 DCA の効果を更に詳しく検討する為に2頭の犬を予めよく訓練し、48時間尿を分割採集し、DCA 注射後の尿酸塩基平衡の変化を時間的に追求したのものもある。又人についても同様の実験を健康成人男子8名に就いて観察した。此等の精密観察の DCA 注射量は犬の場合は体重当り 1mg/kg であり、人体の場合は 200 μ g/kg B. W である。

B. 測定項目とその方法

測定は血液(血漿)、尿等の体液の他、実験の目的によっては呼吸の分析も併せ行った。

血液、尿については pH, CO₂, 尿 NH₃, 尿滴定酸度, Na, K, Cl 等の電解質の諸成分を検し、殊に腎機能を検査するために Creatinine clearance または Inulin clearance によって GFR を測定し、又これより塩水分濾過量及び逆吸収量等を算出した。以下それら各項目についてその方法を述べる。

採血は一般には頸静脈或は下肢伏在静脈より行った。連続血液 pH 測定時は Heparinize した。動脈血を頸動脈の一端より細いビニール管に誘導しこれを循環血用硝子電極に連結した後、電極の他端より再びビニール管を導いて頸動脈の他端に帰す。又このビニール管の一部にはガラス製 T 字管を挿入し、その側管から動脈血試料を採集する事が出来る様にした。

採尿に当っては膀胱カテーテル法を用いた。犬を麻酔していない場合には、No. 3 又は No. 4 のネラトンのカテーテルに尿道表面麻酔剤(キシロカインゼリー)のごく少量を塗布し、これを膀胱に挿入する。かくて随時に下腹部を圧迫して出て来る尿を空気に触れしめぬ様に検定目盛付試験管中流動パラフィン層下に導いて採集した。

尙血液(漿)、尿等の試料の貯蔵に際しては 6°C の冷暗所に保存した。

又実験に際し、酸、イヌリン、クレアチニン、その他栄養液の注入に際しては、吾教室にて設

計した持続注入装置を用いて定常速度で持続した¹⁴⁾。

クリアランス測定法の細部については別に記載したから¹⁶⁾、ここには省略するが、犬に於いては Inulin clearance と Endogenous creatinine clearance とは実質的に殆んど相一致するので、この何れかを用いる事にした。

血液 pH 測定に際しては、その時間的推移を詳細に追究せんとして、吉村及び著者(1959)¹⁴⁾の考案せる循環血液用ガラス電極によって迅速確実に直接測定を行った。又場合によっては島津 GM-1 型 pH 計と¹⁷⁾、電子管式自働平衡記録計を結合して連続記録を行ったものもある。但し連続記録の要なき時は、採血せる血液の pH を吉村式注射器型硝子電極により実験後直ちに測定した。尿 pH 測定も同様である。

呼吸描記装置は高木氏¹⁸⁾(1951)の示せる装置を 10 kg 位の犬に適用出来る様に多少改良して用い、酸注入時の呼吸状態の変化をタンブールによってキモグラフィオン上に描記せしめた。実験後にこのタンブールの動きを検定して換気量を算出した。

呼吸ガスの分析は Douglass bag 法にて労研式ガス分析器を用いて行った。

血液或は尿の総炭酸量は 斎藤氏¹⁹⁾による Micro-Van Slyke 装置(1937)により測定し、同一のサンプルの pH から Henderson Hasselbalch 式により HCO₃⁻濃度を算出した。本計算及び pCO₂ の計算に於いては pK' として血液及び尿で夫々 6.10 及び 6.33 - 0.5 $\sqrt{\mu}$ を採用した。但し μ はイオン強度であって、尿の場合には $\mu = 0.1 - 0.7$ であり、何れも尿中の塩分濃度の実測値より概算したものである。

又尿の滴定酸度の測定は教室の浅田²⁰⁾(1956)が考案せる尿滴定電極を著者がより微量サンプル(0.5-1 cc)にて測定出来る様改良して測定した。NH₃ は Seligson and Seligson 氏法²¹⁾(1951)、又 Na 及び K は Lange 焰光光度計を用い²²⁾、血漿 Cl は Schales & Schales 氏水銀塩滴下法²³⁾、尿 Cl は同 Brun 氏²⁴⁾変法を用いた。P の測定は Gomori 氏²⁵⁾法によった。但

しこの内の NH_3 の排泄の詳細に就いては杉本の論文にゆずる。

イヌクリンおよびクレアチニンは夫々Schreiner氏²⁶⁾法及び Folin & Wu 氏²⁷⁾法により測定

した。

Ⅲ. 実験成績

A. 正常犬酸注入実験

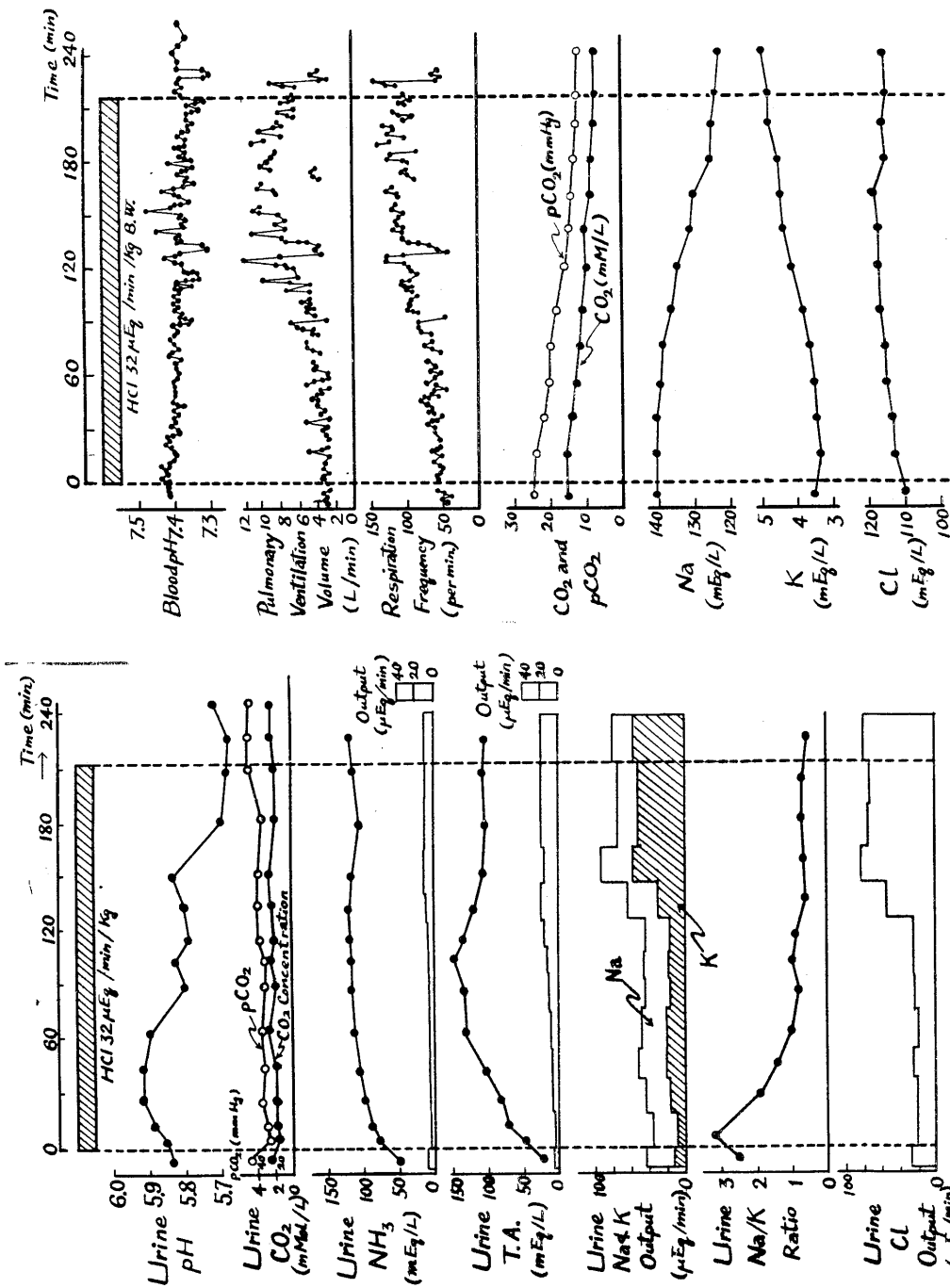


Fig. 2. A. Effect of HCl infusion on blood of normal dog.

Fig. 2. B. Effect of HCl infusion in urine of normal dog.

正常犬に酸を注入した実験の1例は第2図に示されている。塩酸の注入速度は犬体重 kg 当り毎分 $32 \mu\text{Eq}$ であって、213 分間に亘って持続注入した。第2図Aはその血液諸性状の変化であり、Bは尿成分の変化を示す。第2図Aのごとく、血液の pH は酸注入開始と共に漸次に低下して行くが、これは決して滑かな曲線ではなく、激しい変動を示す。それは呼吸の変動を伴っている事より、動物が血液中の酸根である所の H_2CO_3 を放出して、酸塩基平衡を保たんとする活動の現れである。而して呼吸の促進は先ず呼吸量の増加に著明に現れ、呼吸数の増加はこれに遅れる事は一般呼吸機能促進の場合に同じである。かくして酸注入を終る時は血液 pH は直ちに上昇を始め、呼吸も鎮静する。

以上の事実は血漿の CO_2 濃度に就いて見ても著明であって、酸注入の進行と共に低下し、且つこの場合の pCO_2 を Henderson-Hasselbalch 式より計算してみると、これも亦著明に減じている。一方血漿 Na も減少の傾向を示すが、逆に K は増加傾向をたどる。従って酸注入の結果細胞内外の Na 及び K の交換が促進している事が暗示される。Cl 濃度は酸注入後増加しているが、これは注入せるものが HCl である事より当然である。

以上の血液の酸塩基平衡の変化に伴う尿の酸塩基平衡の変化を見るに、第2図Bに於いて尿 pH は酸注入開始後1時間頃より減少を始め、酸注入を終えた後も暫時は低下を続けるが、やがて漸次に復帰の徴を示す。又尿 pH の低下に応じ、尿滴定酸度や NH_3 の排泄増加が認められる。そして酸性尿時には尿 CO_2 濃度は減少して殆んど消失に近い値をしめしている。尿中 Na や Cl の排泄は、尿量により著しい変動を示すが、時を追って前者はその排泄の軽度減少を、後者はその排泄増加を認める。尿 Cl は Na

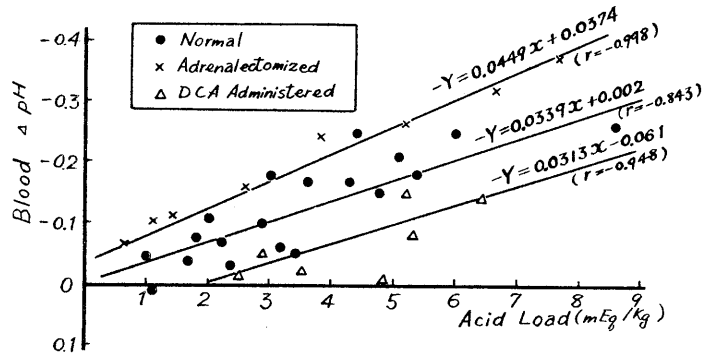


Fig. 3. Relationship between decrease of blood pH and acid load on normal, adrenalectomized and DCA administered dogs.

及び K とほぼ平衡して排泄されているが、時間が経つにつれ尿 Na が漸次にアンモニアに置換されて、 NH_4Cl の形として出される為に尿 Na と K の排泄に比べれば稍々遅れて増加して来る。尿 K は増加傾向をとる。従って尿 Na/K 比は低下して来る。この尿 Na/K 比の推移からして副腎皮質ホルモン等のミネラルコルチコイドの影響も充分考えられる。

以上は正常犬への酸注入の影響を図によって例示したものであるが、これと同様の実験は15例の犬に就いて、その注入酸量を体重 kg 当り 1 mEq から 8 mEq の範囲で種々に変えて行ったが、その結果は大同小異である。ただ酸負荷の影響は酸の注入量や注入速度によって違って来ると思われるから、これに就いて若干説明を補足する。

第3図は犬に酸を負荷した際に、その負荷酸量と酸注入終了時の血液 pH 低下度の関係を示したものである。図の黒丸印は正常犬についての成績である。図示の如く血液 pH の低下度は負荷酸量と良き順相関を示し、負荷量が大きい程 pH の変化も大きい。但しこの場合に酸注入速度と pH の変化量の関係を見たが、同一の負荷量に就いては注入速度の遅速によって大きい変化が見出せなかった。これは注入せる酸が速かに血管外に拡散して細胞外液により緩衝せられる為に、多少の注入速度の遅速は殆んど酸の緩衝に無関係となるからである。

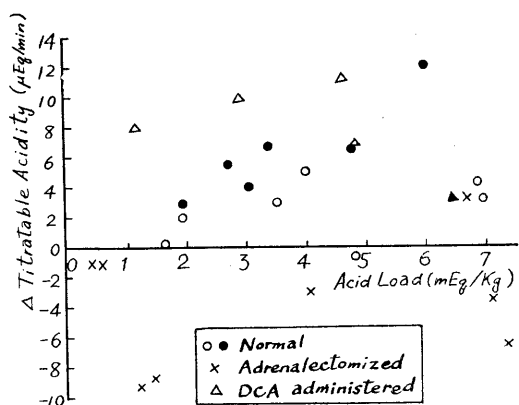


Fig. 4.

Relationship between acid load and change of titratable acidity of normal, adrenalectomized and DCA administered dog.

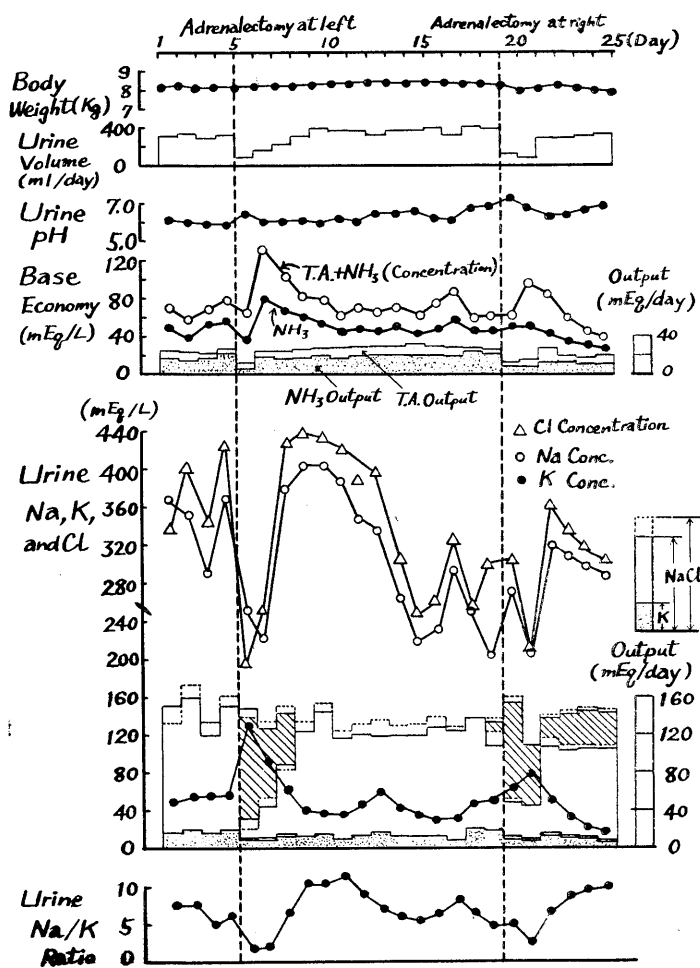


Fig. 5. Daily Observation of urine after adrenalectomy (Dog).

次に酸性尿について見るに、第4図は酸負荷量と尿滴定酸度(T.A)の変化量(対照期に比べて酸負荷直後増加せる場合を正とする。)との関係を見たものである。図の黒丸はその尿pHが酸注入前に7以上をしめたもの、中空の丸はpH7未満のものである。尿pHが7以下の場合には既に酸注入前に尿はかなりのT.Aをしめしている関係上、酸注入による増加量と負荷量との相関は必ずしも有意とは言いがたい。その原因としては酸負荷が尿細管細胞に働いて、酸性尿の生成を行う機転に関係するものと思われるが、詳しくは考按の部に再び論ずる事にしたい。

尙本実験に際して測定した尿アンモニア排泄量に関しては杉本の論文に詳しいから、ここには省略する。

B. 副腎皮質ホルモンの影響に就いての実験

正常犬についての酸注入実験によってそのAcidosisの在り方や動物の酸処理機能が明かとなったから、次にこれを対照として副腎皮質を摘出した犬について酸注入実験を行い、Acidosisに際する副腎皮質の意義を明かにせんとした。

1. 副腎摘出の影響

動物の副腎を摘出した場合の尿酸塩基平衡を連日24時間尿に就いて観察した1例を第5図に示す。此の種の観察は10例に就いて行ったが、大体同じ様な傾向を示した。さて第5図に於いて、左側及び次いで右側の副腎

摘出を行った翌日（第1日）には夫々尿 pH の一時的上昇が観られた。又図の黒丸は尿アンモニア濃度であり、中空の丸は尿アンモニアと滴定酸濃度の和をプロットしたものであるが、何れも摘出の翌々日（第2日）に上昇している。これらの1日排泄量は、アンモニアは点を打ったヒストグラムにて、滴定酸量はその上に積算した空白のヒストグラムにて示されている。このアンモニア排泄量と滴定酸排泄量の和が、腎にて節減し得た利用塩基に相当するという考えに基いたものであって、従来より塩基経済量 Base Economy²⁸⁾と称せられたものである。さてこの塩基経済量は左側副腎摘出後一過性に低下を来たすが、2日目には直ちに対照値に回復している。従ってさきに見た手術翌々日のアンモニア濃度や滴定酸度の上昇は尿が減じた為に濃縮して現れたことによる。一側副腎摘出後2週間経て反対側即ち右側の摘出を行ったが、塩基経済量は低下し、今度は旧に復さず著明な塩基節減作用が頃に減少しているのである。

次に尿 Na, K 及び Cl に就いて見るに、三角印、白丸及び黒丸で示したのは夫々尿 Cl, Na 及び K の濃度を指す。下方のヒストグラムは実線及び点線で囲んだ部分が夫々 Na 及び Cl の1日排泄量であって、図の中一面に点を打った領域は K 排泄量を示す。尙斜線を引いた部分は犬の1日の残飯量を計量して、一定食中に含まれた Na, K 及び Cl 量の灰化法によって測定し、これを試みに尿中排泄量の上に積算したものである。図示の如く、手術後数日間は Na, Cl 等の塩分排泄量が減じているが、これは犬が手術の後食餌をとらない為である。従ってこれに残飯中の塩分量を附加するとそのレベルは手術の有無に関せず一定となる。

さて図から判断せられる如く、Cl 排泄量は手術直後を除き、Na 排泄量と K 排泄量を合わせた量とほぼ平行している事がわかる。即ち Cl は常時は殆んど中性の NaCl 及び KCl として排泄されていた事を示す。ただ Cl は手術の当日乃至翌日は Na と K の排泄と平行せず、その排泄がやや遅れる傾向がある。従って手術翌日

は尿中塩基過剰によって尿 pH がやや上昇を示しているわけである。これは要するに副腎摘出術によって、Cl に比して Na 及び K などの固定塩基の過剰脱出が起っている事を物語るものである。

尿 Na/K 比は副腎摘出直後は低下するが、後に上昇して、対照値を上廻っている。副腎摘出後一過性に下るのは手術時の Stress による Mineral corticoid の変調によるものであり、摘出後3日以後の Na/K 比上昇は明かに副腎不全の本格的な徴候と言えよう。副腎摘出犬に対する酸注入実験は、以上の点に留意して観察し、両側摘出後4日目に行う事にした。

2. 副腎摘出犬への酸注入実験

両側副腎摘出後4日目に種々の量の塩酸を静脈内に持続注入した。ここでは $34 \mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ の注入速度で酸を負荷した1例を第6図にしめす。図の A は血液性状、B は尿性状である。一般に副腎摘出犬は血液 pH が酸注入前に於いて正常犬のそれより低く、多少 Acidosis の傾向を示す。本例に於いて最初酸注入後直ちに血液 pH が対照期のレベルより上昇し、著明な初期上昇現象を示している。これは正常犬でも副腎摘出犬でも共に見られる現象であって、呼吸促進に基く pH の一時的上昇に外ならぬ。併し酸注入が進行すると血液 pH が漸次に低下していくのであるが、ここで正常犬の場合と異なることは pH 低下速度が非常に急速であることである。即ち第2図に示した正常犬では上記と略同程度の注入速度 ($32 \mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$) であつたが、血液 pH の変化はそれ程著明ではなく、約3時間にして 0.06 pH の低下の程度であつたが副腎摘出犬では約3時間の注入により 0.3 pH の低下を来している。この様な血液 pH の低下は麻酔が深い場合に呼吸機能が低下して現れるのであるが、副腎摘出犬の場合には麻酔は極めて軽くしたにも拘らず、呼吸の反応はそれ程顕著でなく、この様な大きい pH 低下を示したのである。その原因としては副腎摘出犬は体力が非常に弱っている為に呼吸運動による CO_2 呼出の反応が弱く、加うるに血液量は副腎摘出によ

って減少してその緩衝作用が少くなっている。又奥村¹⁵⁾によれば、注入せる酸は漸次に細胞内液により中和せられて行くのであるが、この細胞内液による中和に際しては、細胞膜を介する

イオン交換が重要な役割を演じている。この様なイオン交換には副腎皮質ホルモンが影響しているから、皮質ホルモン欠乏によってイオン交換機能の低下を来して細胞内液による緩衝作

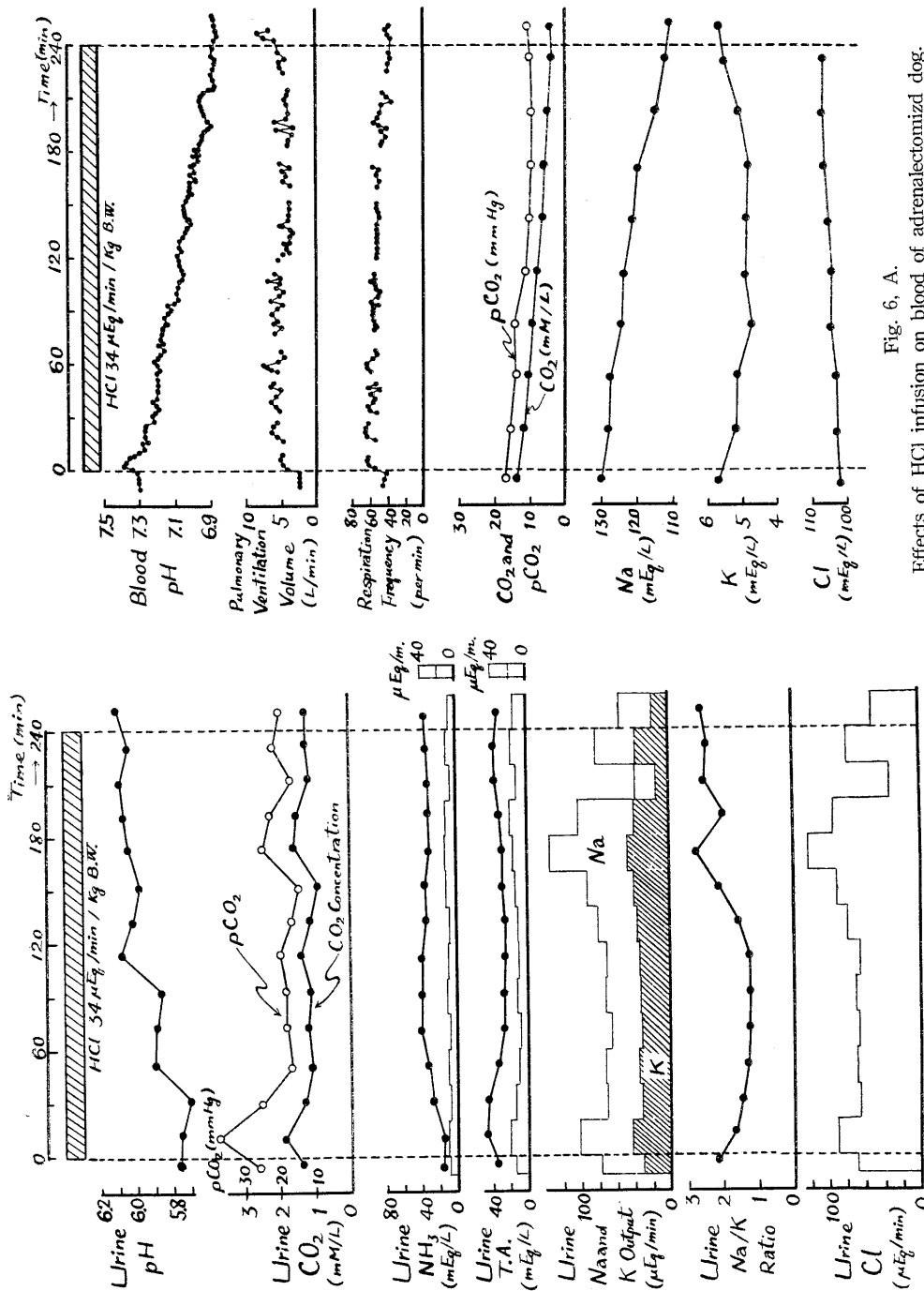


Fig. 6, A. Effects of HCl infusion on blood of adrenalectomized dog.

Fig. 6, B. Effects of HCl infusion on urine of adrenalectomized dog.

用を減殺せる事もその一因と考え得る。其の他に原因として考えられることは酸注入に際する腎臓の反応即ちアンモニア生成や滴定酸度の増加が副腎摘出によって減少してしまうことである。即ち尿性状について見ると、第6図Bの如く、先ず尿 pH は血液の Acidosis が激化するにも拘らず、漸次上昇を示し、これは Bicarbonate の脱出によるものである事は明かである。尿アンモニア、滴定酸度は正常犬のごとく増強して来ない。尿中 Na は著明なる増量を示し、逆に K はむしろ減退の所見を呈する。従って尿 Na/K 比は正常犬の如く低下を示さず、反対に増加を来たす。要するに副腎摘出犬に酸を注入しても腎臓による過剰酸根処理が行われないのであって、これも亦血液 pH が低下し易い原因の1つをなしているのであろう。第3図の×印は各種の酸負荷量に対する酸注入終了時の血液 pH 変化量をプロットしたものであるが、各酸負荷量に対する血液 pH の低下度は、正常犬の夫に比して一段と大きく、明かに正常犬の回帰線と異った回帰線上に集っている。

又第4図の×印は酸負荷量と尿滴定酸度増加量の関係をプロットしたものであるが、副腎摘出犬では、酸注入によって、対照時の値より減ずるものが多い事がわかる。

3. 副腎摘出犬への DCA 投与の影響

以上の如く副腎摘出によって血液 pH の低下度が激しく、尿の酸根処理能を失する事が明かとなったが、この事を更に確める意味で、副腎摘出犬に DCA を注射し、これが利いて来たとと思われる約2時間後に酸を注入してその時の

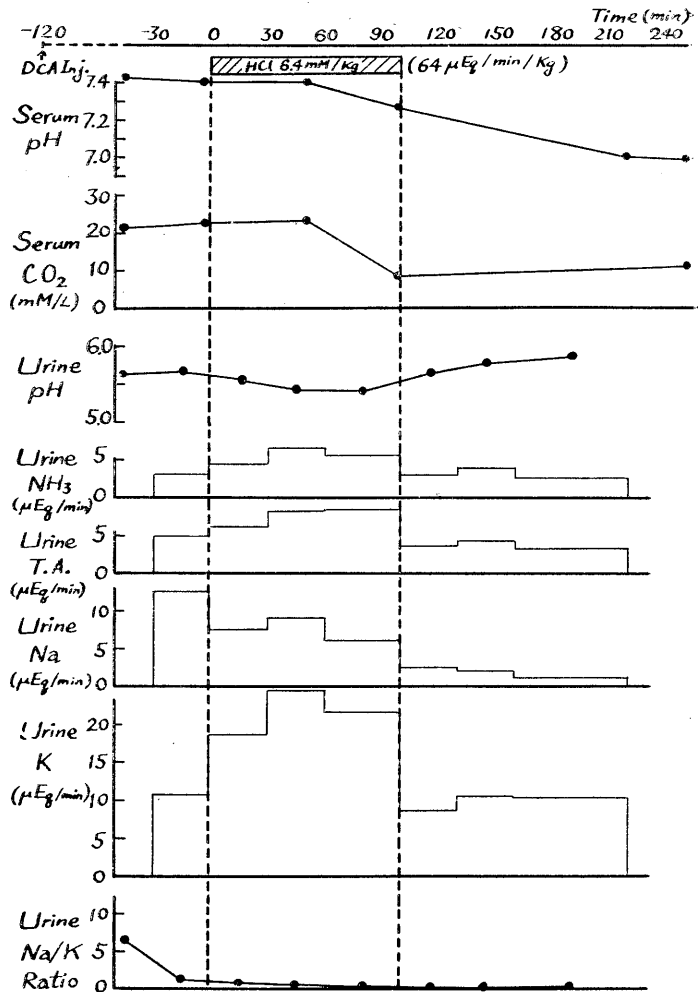


Fig. 7.

Influence of DCA on urinary & blood electrolytes of adrenalectomized dog.

acidosis につき観察を行った。その1例は第7図に示す。酸負荷は犬体重 kg 当り 6.4 mEq であって、体重 kg 当り 6.4 μEq の注入を行った。注入終了時 (100分) の血液 pH は 0.13 の低下を示している。この場合尿 pH は既に対照期に於いて酸性尿を示しているが、次いで酸を注入した場合に酸性化がやや増強し、それと共に尿滴定酸度も尿アンモニアも増加しているのが見える。Na 排泄の低下と K 排泄の増加によって尿 Na/K 比は著明に低下し、副腎皮質ホルモンがよく働いている。

4. 正常犬に対する DCA 投与の影響

吉村等によれば正常人の筋肉内に DCA 1mg/kg を注射して尿の酸塩基平衡の日内変動に対するDCAの影響を調べて見ると、注射後2時間より数時間以上に渉り尿の酸性化が現れ、その間正常時に見られる Alkaline tideが消失する。そして又滴定酸度及びアンモニアも軽度に増加を示す。尿中電解質は DCA 注射後尿Kの増加と尿 Na, Cl 等の減少により、尿 Na/K 比は著明に低下する。これと同様な事は著者の研究に於いても確められたが、今回は更にこれを正常犬に注射してその効果を検討してみた。この

種の実験は2匹の犬で4回行ったが、第8図にその1例をしめす。先ず DCA の注射前には尿 pH は午前中は低下し午後には上昇するが、それに対応して午前中にはアンモニア分泌や滴定酸度の上昇が現れている。DCA を注射すると尿 pH の酸性化には著明な影響はないが、尿中滴定酸度やアンモニア分泌の増加が見られる。これは午後になっても消失せず存続している。又 DCA 注射犬で Na 排泄低下、K排泄の増加が起る事は明瞭である。

この様に正常犬に DCA を注射した後に、酸を注入してみると、血液 pH 低下度は無処置の正常犬酸注入時より少ないが、尿滴定酸度、アンモニアの排泄は増大傾向が強くなる、第3図の△で示した点は DCA 注射犬に酸を負荷した場合に、その負荷量と血液 pH 低下度との関係を示したものであって、明かに正常犬よりも血液 pH 低下度は低い。その回帰線は正常犬よりも低い位置にある。

又第4図の△印は DCA 投与後酸を負荷した場合の酸負荷量と尿滴定酸度増加量の関係であるが、酸負荷によって滴定酸の増量が大いことをしめしている。以上により DCA 投与犬は Acidosis に対する抵抗性が強いと思われる。

IV. 考 按

以上著者は正常犬に於いては、これに酸注入を行って急性 Acidosis に陥入れた時、酸性尿の生成、尿アンモニア排泄等の増加が出現するが、一方副腎摘出犬に於いてはかかる増強が起らず、却って減弱を示す事が多いのを観察した。その他人や犬に DCA を適当に投与する時は尿滴定酸度及びアンモニアを増量せしめ得ることをも確め得た。第9図A及びBは此等の著者の成績をまとめて図示したものであって、夫々血液 pH 及び血漿 CO₂ 濃度と尿滴

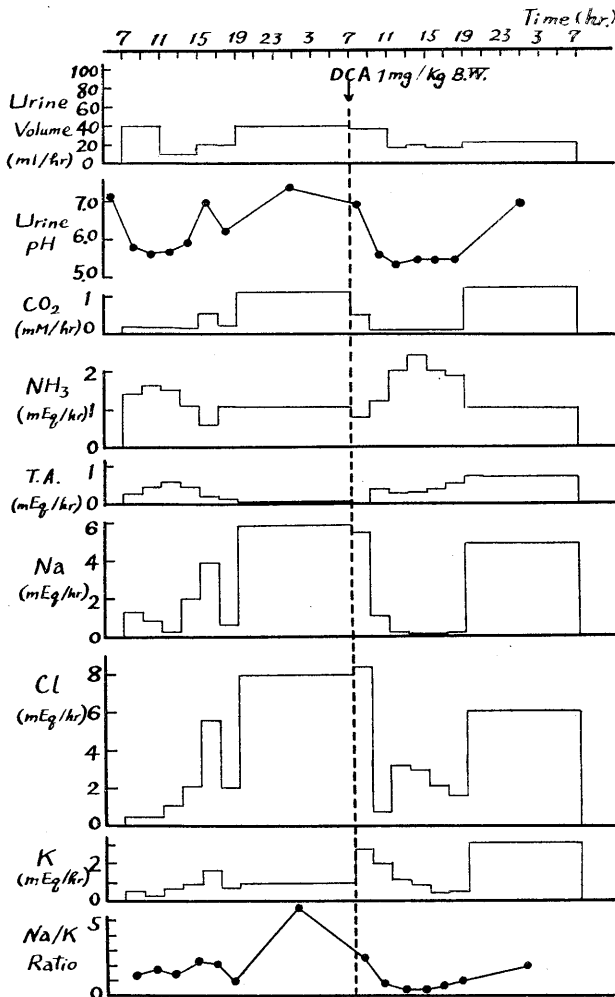


Fig. 8.

Effects of DCA on diurnal variation of excretion of urinary electrolytes in dog.

定酸度との間に密接な逆相関が成立し、然もその回帰線は副腎摘出によって低下している。

さて今日、酸性尿生成機転に関して提示せられている学説は Smith, Pitts のイオン交換説⁴⁾であるが、その概要は次の如くである。

1) 遠位尿細管で管腔中の Na^+ が任意調節的逆吸収を受ける時、これと交換に細胞内の K^+ 及び H^+ が分泌される。尙この H^+ は炭酸脱水酵素の存在の元で細胞内の代謝性 CO_2 から由来したものである。

2) この Na^+ とイオン交換に与る H^+ と K^+

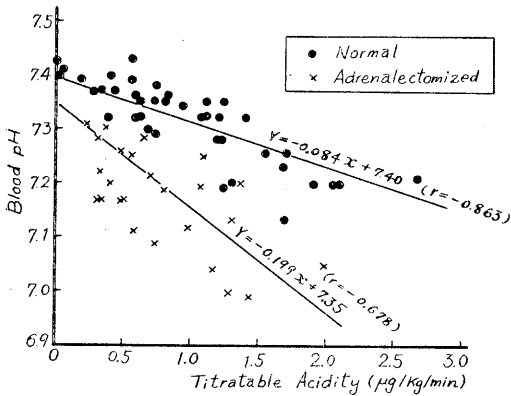


Fig. 9, A.

Correlation between blood pH and titratable acidity in urine of the normal and adrenalectomized dog during acid infusion.

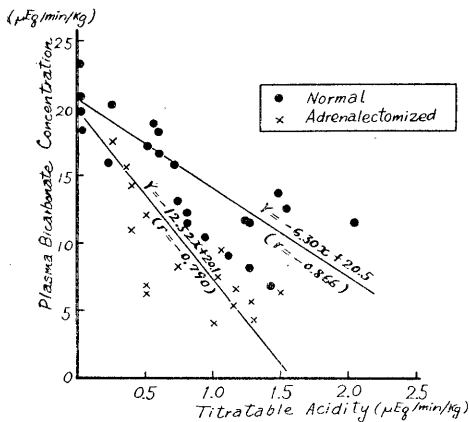


Fig. 9, B.

Correlation between plasma bicarbonate concentration and urinary titratable acidity in normal and adrenalectomized dog during acid infusion.

は体液酸塩基平衡が正常に保たれている場合には互に競争的分泌を行う²⁹⁾(Berliner).

即ち酸性尿生成機転の要因としては濾液中の Na^+ と細胞内の K^+ 及び H^+ の交換過程とその調節機構が重要である。そこで Acidosis に際して酸性尿の生成が増加する原因がこの何れの要因の変化に基づくかに就き、著者が行った実験成績に基づいて検討していく事にする。

先ず尿細管細胞に於ける Na^+ と K^+ , H^+ との交換過程が Acidosis の直接の影響として如何なる変化を受くるやに就き考うるに、Pitts は Acidosis に際する尿細管細胞内の K^+ の欠乏が NaHCO_3 の逆吸収を促進する事が原因である事を強調している¹⁰⁾。そこで此の様な細胞内の K^+ 濃度と尿滴定酸度との関係を検討する為に第10図に血漿 K 濃度と滴定酸度との関係をプロットしてみた。この成績は酸注入によって Acidosis を来した場合の血漿 K とその時の尿の滴定酸の1分間体重 kg 当りの値である。酸を注入するとその H^+ が筋肉細胞内の K^+ と交換して、細胞内に浸入して、ここに遊出せる K によって血漿 K 濃度が高まる。従って血漿 K 濃度が高い場合程、細胞内の K^+ は減少し、逆に H^+ が増加する訳である。図示の如く血漿 K 濃度が高まれば

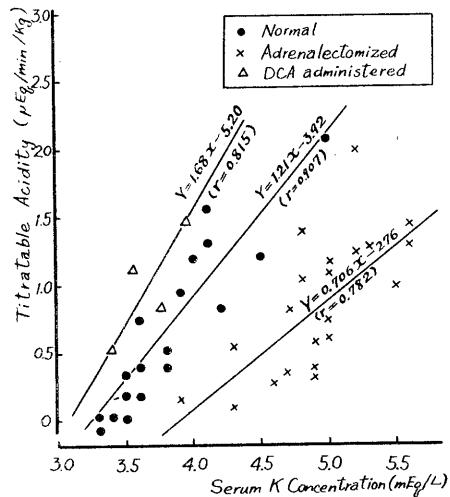


Fig. 10.

Correlation between plasma potassium concentration and urinary titratable acidity of normal and adrenalectomized dog.

ば滴定酸の生成も亦増して来る。この事はまた NaHCO_3 の逆吸収の増加することをも意味する (Roberts, 1956)³⁰⁾。従ってこの成績は将しく Ritts 等の考えを裏付けたものと言えよう。併し、この場合に果して K^+ の欠乏が酸性尿の生成を増したのか、又は細胞内の H^+ 濃度の増加が滴定酸の生成を増したのかはここで断言する事は出来ない。

曾って吉村、奥村ら (1958)³¹⁾ は等張性 KCl を犬に静注し、その血漿 K 濃度を上昇せしめ、尿 pH は逆に上昇して滴定酸度の減退を来した事を報じている。この場合には血漿 K 濃度の増加によって細胞内 K 濃度が高まっているのであるから、尿細管細胞内にも同様の影響があると見做すべきである。従って Pitts 等の説く如くこの場合には Na^+ と H^+ の交換が阻げられて、滴定酸度が減ずるの理である。併しこの場合にも細胞内 H^+ は逆に K^+ と交換して細胞外に遊出しているから、細胞内 pH は上昇したと考えられ、これが滴定酸生成の減退の原因であったかも知れない。

この様に細胞内 K^+ が H^+ の何れかが滴定酸度生成を主役を演ずるかは何れであってもここに注目すべき事がある。それは第10図に於いてこの血漿 K 濃度と尿滴定酸量との関係が正常犬、 DCA 投与犬について夫々異っている事である。即ち副腎を摘出する事によって、同一の血漿 K 濃度に於いても正常犬に比して滴定酸の生成が少い。又逆に DCA を投与すると滴定酸生成が増強する。従って滴定酸度生成を支配するものは細胞内の K^+ 濃度又は H^+ 濃度のみではなく、むしろ副腎皮質の *Mineral corticoid* の働きによって、滴定酸度生成が促進をうけていると考えて良いのであろう。

元来 *Mineral corticoid* は尿細管細胞に働いてその Na^+ の逆吸収を促進すると言われ、 Na^+ の逆吸収の促進に伴って H^+ の交換が促されて、ここに酸性尿生成が増すと考える事は極めて合理的である。*Mineral corticoid* の働き方についてはこれが間接的に血液性状を変化させて後に腎臓に働くとの見方もあるが、今村の研究

によれば、むしろ直接尿細管細胞に働くと考えた方がよい事は緒言にも述べた通りである。而して第9図に示す如く血液 pH 又は予備アルカリの低下 (*Acidosis*) に伴う酸性尿生成の増加率 (回帰係数) は副腎の存在する事によって増加するのであるから、血液の *Acidosis* が副腎に直接影響してその機能をかえるのであろう。これは恐らく *Mineral corticoid* の分泌が *Acidosis* に際して増す為であろうが、その詳しい事は将来の研究にまつ外はない。要するに *Acidosis* に際する酸性尿生成の促進に対しては尿細管細胞の Na^+-K^+ , H^+ 交換の調節機構の変化も亦有力に働いていると言う事である。併し副腎を摘出してしまった動物に於いても血液 pH や予備アルカリの減少に伴って滴定酸度が比例的に増す事実は、酸性尿の生成が単なる副腎皮質作用のみによって支配せられるものでない事を示している。これは恐らく上記の Pitts 等の説の如く、血液の *Acidosis* そのものが尿細管細胞内組成に影響して、その Na^+-H^+ , K^+ 交換機転をかえる事に原因があるのであろう。

要するに *Acidosis* に際し、酸性尿が増加する理由は血液の *Acidosis* 自身が尿細管細胞内の Na^+-H^+ , K^+ 交換機構に影響する事と、これが先ず副腎皮質に影響して恐らくその *Mineral corticoid* の分泌を変化せしめ、これが Na^+-H^+ , K^+ 交換機構に影響する事の2つによって説明すべきであらう。

尙 Na^+-H^+ , K^+ 交換の調節機構としては副腎皮質のみしか働かないかどうか、これは将来の研究によって決定すべき問題である。

V. 総 括

正常犬、副腎摘出犬及び DCA 投与犬に 0.16 N 塩酸を静脈内へ持続的に 1-2 時間に渉り、総量 $2-9 \text{ mEq/kg}$ を負荷して、急性代謝性 *Acidosis* を起させた際にその血液及び尿酸塩基平衡に対する影響を観察し、尿酸性化の機転につき考察を加えた成績の大要は次の如くである。

1) 酸を注入すると血液は絶えず 0.1 pH 程度の変動を繰返し乍ら、漸次下降を示す。この

変動は酸注入によって呼吸機能が促進を受けるからである。酸注入終了時の血液 pH 低下度は 1 mEq/kg の酸負荷量に就き、0.05 pH 程度の低下を示すが、その低下の度合は副腎摘出犬、正常犬、DCA 投与犬の順に激しい。酸注入後は血液 pH は時間をかけて徐々に回復していく。

2) Acidosis になると正常では尿の滴定酸度及びアンモニアは対照値に比べて増加し、血液 pH と尿の滴定酸度およびアンモニア排泄量との間には逆相関を証明するが、副腎摘出犬では Acidosis に際する尿の酸性化は著しくないが、併し副腎摘出犬に DCA を与えてから酸注入を行うと著明な尿酸酸性化がおこる。又正常犬に DCA を投与してから酸を注入した群は尿滴定酸度が正常犬の増量の程度よりも大きい。

3) 酸注入により血液中の Na^+ 、 HCO_3^- 等が減少し、 K^+ 及び Cl^- 濃度が著明に増して来る。その血漿 (清) K 濃度と尿中滴定酸度の関係を見ると、両者は正の相関関係を示すが、副腎摘出犬では血漿 K 濃度が高く、然も尿の酸生成が正常犬より少い。此等の事から尿滴定酸生成を支配するものは細胞内 K^+ 濃度又は H^+ 濃度のみではなく、副腎皮質 Mineral corticoid の働きも亦重要であるも考えられる。

4) 以上によって著者は酸注入時の尿滴定酸度の増加に関して、血液の Acidosis の場合には Mineral corticoid の分泌が増し、尿細管細胞の Na^+-H^+ 、 Na^+-K^+ 交換反応を促進して酸性尿生成の促進が起るものと考えるのが合理的である。但し副腎摘出犬にても血液 pH の低下につれて僅か乍ら滴定酸度が増すから、この外に酸性尿生成の機転を考えべきである。それには従来より知られた如く、Acidosis に際して尿細管細胞内の H^+ イオン濃度が増し、 K^+ イオンの脱出を来し、これが原因となって腎尿細管の Bicarbonate 逆吸収が増加して酸性尿生成を促進する事も考えられる。

稿を終るに臨み、終始御指導、御鞭撻を賜り、且つ御校閲の労を賜った恩師吉村寿人教授に対し深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) Montgomery, H. and Pierce, J. A. (1937) Am. J. Physiol. **118**, 144
- 2) Sendroy, J. Jr., Seelig, S. and Van Slyke, D. D. (1934) J. Biol. Chem. **106**, 479
- 3) Smith, H. W. (1956) Principles of Renal Physiology, New York, Oxford Univ. Press
- 4) Pitts, R. F. and Alexander, R. S. (1945) Am. J. Physiol. **144**, 239
- 5) Loeb, R. F., Atchley, D. W. Gutman, E. B. & Julson, R. (1933) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **31**, 130
- 6) Harris, F. D., A. F. Hartmann, J. D. Rolf, and H. L. White (1952) Am. J. Physiol. **168**, 20
- 7) Strahl, I., Atchley, D. W. & Loeb, R. F. (1936) J. Clin. Invest. **15**, 41
- 8) Pitts, R. F. (1951) in Adrenal cortex, Transactions of the Third Conference, Josiah Macy, Jr. Foundation, New York, N. Y. 210 pp, p 11
- 9) Roberts, K. E., and Pitts, R. F. (1953) Am. J. Physiol. **172**, 47
- 10) Giebisch, G., M. B. MacLeod and R. F. Pitts (1955) Am. J. Physiol. **183**, 377
- 11) Wilson, D. L. (1957) Am. J. Physiol. **190**, 104
- 12) 今村 昭 (1959) 診療 **12**, 1642
- 13) Sherwood Jones, E. (1958) Experimentia, **15**, 72
- 14) 吉村寿人・藤本 守 (1959) 日新医学 **46**, 33
- 15) 奥村 修 (1958) 日本生理誌 **20**, 966
- 16) Yoshimura, H. et al. (1960) Jap. J. Physiol. **11**, (印刷中)
- 17) 吉村寿人・藤本 守 (1959) 計測 **9**, 138
- 18) 高木健太郎・他 (昭和26年) 医学と生物学 **19**, 307
- 19) 斎藤幸一郎 (1937) 日本生理誌 **2**, 213
- 20) 浅田照夫 (1956) 日新医学 **43**, 513
- 21) Seligson, D. and H. Seligson (1951) J. Lab. & Clin. Med. **38**, 324
- 22) 吉村寿人・井上太郎 (1959) 日新医学 **46**, 1
- 23) Schales and Schales (1941) J. Biol. Chem. **140**, 879
- 24) Brun, C., in H. W. Smith (1956) Principles of Renal Physiology Oxford Univ. Press, 214, New York, Asper et al. (1947) J. Biol. Chem. **168**, 779
- 25) Gomori, G. J. (1942) J. Lab. & Clin. Med. **27**, 955
- 26) Schreiner, G. E. (1950) Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. **74**, 117, H. Smith (1956) Principles of Renal Physiology. p 209
- 27) Folin, O., and Wu, H. (1919) J. Biol. Chem. **38**, 81
- 28) Best, C. H. and N. B. Taylor (1955) The Physiological Basis of Medical Practice. 461 Baltimore
- 29) Berliner, R. W., Kennedy, T. J. Jr., and Hilton, J. G. (1950) Am. J. Physiol. **162**, 348
- 30) Roberts, K. E. et al. (1956) Metabolism. **5**, 404
- 31) 吉村寿人・他 (1958) 日新医学 **45**, 716

