

脳髄カン流法によるクエン酸生成について

Citric Acid Formation by Cerebrospinal Perfusion Method

戸田 茂 黒田正清

緒 言

脳髄は肝、腎等とことなり、そのエネルギー源を脂肪酸によらず、もつばら炭水化物とくにブドウ糖¹⁾²⁾³⁾に依存しているが、Ochoa⁴⁾、Utter⁵⁾らによつてブドウ糖は Embden-Meyerhof-Parnas の経路をへて無酸素的に乳酸に移行することが明らかにされ、さらに Ochoa⁶⁾によつて Harden-Young エステルは乳酸とフォスフォグリセリン酸とになることが証明されている。

一方脳髄のピルビン酸酸化によるクエン酸の生成機序に関しては、すでに多くの人々によつて行われている。そのうち Peters⁷⁾はその代謝にはピルビン酸が必要であることを指摘している。また、Coxon⁸⁾らによればピルビン酸に蓚酢酸が加えられたときには、クエン酸の生成量は幾らでも増大するが、逆に蓚酢酸が与えられないときには、クエン酸はほとんど生成されず主として酢酸が生成されることを指摘している。

さらに、Lipmann⁹⁾、Lynen¹⁰⁾、Stern¹¹⁾らによれば、ピルビン酸はアセチル-CoA をへて、縮合酵素の作用により蓚酢酸と縮合してクエン酸を生成することを証明している。また、Coxon¹²⁾も鳩腦のホモジネート、ならびに切片をもちいた実験において、いずれもクエン酸の蓄積されることを明白にするとともに、その生成比率にもふれ、12:2 の割合であることを明らかにした。

しかし以上の報告はいずれも *in vitro* の条件で行われたものであり、したがつてその結果から、ただちに生体内反応を論ずることは不可能であり、かつ TCA サイクルの3つの3塩基性有機酸、とりわけクエン酸が脳髄のピルビン酸酸化過程においていかなる様相を示すかを追求する目的をもつて、著者らは生体条件に近い井上¹³⁾の考案による脳髄カン流法をもちいて実験を行い、若干の知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

実験動物としては体重 3 kg 以上の家兎をもちい、井上¹³⁾の方法にしたがつてリンゲル氏液で3倍に稀釈した血液 90 ml をもちい、実験家兎は2群にわけて行つた。すなわち、第1群はカン流液に 6 mg のピルビン酸のみを添加したものの、第2群は同じくカン流液に 6 mg のピルビン酸とさらに同 mol の 9.5 mg の蓚酢酸とを加えたものを、おのおの30分間カン流を行い、その前後におけるピルビン酸とクエン酸量とをそれぞれ Friedemann¹⁴⁾および倉富¹⁵⁾らの

測定方法によつて比色定量した。

実 験 結 果

ピルビン酸のみを添加したものは表1のごとく、また、ピルビン酸と蔞酢酸との両者を同時に添加したものは表2のごとくであつた。

第 1 表

Exp. No.	Added; 6mg of pyruvate					
	pyruvate mg %			citrate mg %		
	before perfus.	after perfus.	decrease	before perfus.	after perfus.	increase
1	5.04	4.62	0.42	0.70	1.18	0.48
2	3.61	3.04	0.57	0.50	1.00	0.50
3	3.32	2.92	0.40	0.75	0.81	0.06
4	4.11	3.67	0.44	0.77	0.86	0.09
5	4.25	3.68	0.57	0.64	0.91	0.27
6	3.41	2.93	0.48	0.62	0.77	0.15
7	3.52	3.09	0.43	0.42	0.83	0.41
8	3.40	2.93	0.47	0.57	0.86	0.29
mean	3.83	3.36	0.47	0.62	0.90	0.28

第 2 表

Exp. No.	Added: 6 mg of pyruvate and 9.5 mg of oxalacetic acid					
	pyruvate mg %			citrate mg %		
	before perfus.	after perfus.	decrease	before perfus.	after perfus.	increase
1	4.11	3.74	0.37	1.68	2.81	1.13
2	5.48	3.08	2.40	1.30	2.34	1.04
3	4.07	2.17	1.90	1.04	1.76	0.72
4	5.36	3.42	1.94	1.42	2.16	0.74
5	5.72	3.67	2.05	1.21	2.04	0.83
mean	4.95	3.22	1.73	1.33	2.22	0.89

考 按

表1および表2に示すごとく家兎の脳髓をもちいて、3倍稀釈の血液 90 ml で30分間カン流を行い、その前後におけるピルビン酸とクエン酸との消長について検討した結果、まず表1はピルビン酸 6 mg を負荷してカン流した成績であるが、ピルビン酸については、カン流前の血液からは 3.83 mg%、カン流後の血液からは 3.36 mg%の値をえた。すなわち30分後には

0.47 mg %の減少をきたしていることを認めた。さらにこのさいのクエン酸量については、その前後においてそれぞれ 0.62mg%および 0.90mg%であり、したがって 0.28mg%の増量をきたしていることを認めた。

一方、表2はピルビン酸 6 mg と蔞酢酸 9.5 mg とを同時に負荷してカン流した成績であるが、ピルビン酸についてはカン流前の血液からは 4.95mg%、カン流後の血液からは 3.22mg%の値をえた。すなわち、30分後には 1.73 mg% の減少をきたしていることを認めた。さらにこのさいのクエン酸量については、その前後においてそれぞれ 1.33mg% および 2.22 mg% であり、したがって 0.89mg% の増加をきたしていることを認めた。

よつてカン流実験におけるピルビン酸およびクエン酸の増減は、ピルビン酸のみを添加した場合には、ピルビン酸 0.47mg% の減少、クエン酸 0.28mg% の増加、一方ピルビン酸ならびに蔞酢酸を同時に添加した場合のそれは、ピルビン酸 1.73mg% の減少、クエン酸 0.89mg% の増加という結果になるが、ここに生じたピルビン酸量の減少は換言すれば、これらの量が脳髄において利用されたことを意味する。蔞酢酸を添加するか否かによつて、0.47 mg% と 1.73 mg% と両者の間の利用量に著明な差が生じてくるわけで、その結果として生成されるクエン酸量にも明らかなる差異が生じ、前者の場合には 0.28 mg%、後者の場合には 0.89 mg% とそれぞれ増加する。すなわちこの事実は Peters⁷⁾ の説、さらには Lipmann⁹⁾, Lynen¹⁰⁾, Stern¹¹⁾ らのいわゆるピルビン酸は縮合酵素の作用によつて蔞酢酸と縮合してクエン酸を生成するという説とよく一致し、きわめて注目にあたいするものと思考する。

しかも、ここにおいて注目すべきは蔞酢酸が存在するか否かによつて、クエン酸の生成量には著明な差異が生ずるが、第1群ならびに第2群のおのおのについての利用されたピルビン酸量と、その結果生成されたクエン酸量との比率はほとんど同様で約 2:1 の割合を示すことである。

さらにまた、第1群と第2群とのクエン酸生成量は Coxon⁸⁾ の説のごとく、蔞酢酸が加えられるときは幾らでも増大することなく、脳髄カン流法においては、その比率は約 3:9 の割合である。

結 論

家兎の脳髄カン流実験を行い、ピルビン酸量ならびにクエン酸量を検討した結果、30分間のカン流においては

1) ピルビン酸のみを添加した第1群からは、カン流後にはピルビン酸量は 0.47 mg% 減少し、逆にクエン酸量は 0.28 mg% 増加している結果をえた。したがって、この場合のクエン酸量の生成の割合は、利用されたピルビン酸量の約 1/2 量である。

2) ピルビン酸と蔞酢酸とを同時に添加した第2群からは、カン流後にはピルビン酸量は 1.73 mg% 減少し、逆にクエン酸量は 0.89 mg% 増加している結果をえた。したがって、この

場合もクエン酸量の生成割合は利用されたピルビン酸量の約 1/2 量である。

3) 以上 2 群の実験において、消費されたピルビン酸量と生成されたクエン酸量との間の比率関係は、ほとんど同一割合であるが、第 1 群、第 2 群おのおのから生成されるクエン酸の量的数値間には著明な差異が認められる。すなわち、蔞酢酸が添加されるか否かによつて生ずる第 1 群と第 2 群とのクエン酸量の生成比率は約 3 : 9 である。

文 献

- 1) Coxon, R. V. : Metabolism and Function in Nervous Tissue, Biochemical Society Symposia, No. 8, 4 (1952)
- 2) Stone, T. E. : *Biochem. J.*, **32**, 1908 (1938)
- 3) Klein, J. R. and Olsen, N. S. : *J. Biol. Chem.*, **167**, 1 (1947)
- 4) Ochoa, S. : *J. Biol. Chem.*, **138**, 753 (1941)
- 5) Utter, M. F. : *ibid.*, **185**, 499 (1950)
- 6) Ochoa, S. : *ibid.*, **141**, 245 (1941)
- 7) Peters, R. A. and Sinclair, H. M. : *Biochem. J.*, **27**, 1910 (1933)
- 8) Coxon, R. V. and Peters, R. A. : *ibid.*, **46**, 300 (1950) 47, XXXVII (1951)
- 9) Chantrenne, H. and Lipmann, F. : *J. Biol. Chem.*, **187**, 757 (1950)
- 10) Lynen, F. and Reichert, E. : *Angew. Chem.*, **63**, 47 (1951)
- 11) Stern, J. R. and Ochoa, S. : *J. Biol. Chem.*, **191**, 161 (1951)
- 12) Coxon, R. V. : *Biochem. J.*, **45**, 320 (1949)
- 13) 井上圭爾 : 脳と神経, **3**, 215 (1951)
- 14) Friedemann, T. E. and Haugen, G. E. : *J. Biol. Chem.*, **144**, 67 (1942); **147**, 147 (1943)
- 15) 倉富一興, 細谷憲政 : 生化学, **27**, 72 (1955)