

# 損傷脳の生化学的研究

——浮腫及び代謝へのステロイド剤及び  
冷蔵胎盤抽出物質の影響について——

東邦大学医学部第2外科学教室（指導：栗津三郎教授）

竹 山 照 尚

〔原稿受付：昭和52年5月12日〕

## Biochemical Study on Damaged Brain

——Effects of steroids and substances extracted from  
the cold placenta on edema and metabolism——

TERUHISA TAKEYAMA

(Instructor : Prof. Dr. SABURO AWAZU)

Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University

The purpose of this paper is to study (biochemical) effects of agents on the damaged brain. By using Wistar-rats, effects of steroids and placenta-materials were studied. Agents were administered at various times ranging from the acute phase to the chronic phase. Rats were killed by decapitation at each phase. The brain was removed. Biochemical changes in the cells of the damaged cerebral cortex were studied from the aspect of several factors, and the following results were obtained.

- 1) Cerebral edema appearing at the acute phase was inhibited definitely by the agents, which normalized not only water but also  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$ .
- 2) The agents were effective for free amino acids, nucleic acids and total proteins. That is, they changed the capability to metabolize amino acids, and promoted prompt and effective synthesis of nucleic acids or proteins.

### I 緒 言

脳神経外科領域に於いて脳は血液脳関門 (Blood Brain Barrier) により防禦された極めて恒常性の高

い特殊な環境のもとにある。しかも、脳は外傷を受けるとその構成細胞の1つである神経細胞が変性に陥入り再生することもない。これ等の特徴は多くの問題点を提供している。それは脳損傷によって喚起される脳

Key words : Damaged Brain, substances extracted from the cold placenta, Placenta-materials, The damaged cerebral cortex, Cerebral edema.

Present address : Second Department of Surgery, School of medicine, Toho University, Ota-ku, Tokyo, 143, Japan.

浮腫と言われる概念が、単純に「細胞内外液の移動<sup>1)</sup>」現象として理解されていた1800年代中頃より種々の研究方法<sup>2)-7)</sup>の開発により現在では、1. 血液脳関門(B・B・B)と言われる脳特有の防禦機構の存在、2. 脳損傷に伴って起きる細胞レベルでの種々の代謝的変動と Homeostasis としての細胞内酵素の働き、更に加えて3. 損傷部脳組織に起って来る神経細胞の変性消失、glia 細胞の反応性増殖<sup>8)</sup>と言う形態学的変化等が複雑に関連した現象として考えられ、新たな角度より見直されつつあるからである。臨床医学的にも、このような観点に立って脳浮腫が検討されており、多岐にわたる脳浮腫現象の機構に関する研究が報告されて、これ等のデータに基いて多種多様の薬剤が脳浮腫に対する治療剤、強いては脳細胞の回復・賦活の目的で使用されている。しかし、真の細胞レベルでこれ等の薬剤が如何なる効果をもたらしているのかの基礎的研究は極めて少ない。そこで外傷性急性脳損傷に現在広く使われている steroid 剤、また組織代謝促進剤として近年その有意性が認められて来た冷蔵胎盤抽出物質<sup>9)</sup>(以下 Placenta 抽出物質と言う)の2剤が、細胞レベルで——殊に大脳皮質——如何なる生化学的变化を引き起しているかを一定の条件の下に実験動物(実験的外傷脳)を作成し、急性期から外傷後1ヶ月以上を経過して gliosis が形成される迄投与して、その経時的变化を水分・電解質、遊離アミノ酸、核酸、総蛋白量について生化学的に検討を加えた。

## II 実験方法

### 1) 実験動物作成

中野<sup>10)</sup>・柴田<sup>11)</sup>によって報告施行された方法に従い、重量約250~300grのWistar系ratを雌雄の別なく使用し切截手術を加えて急性脳損傷を作成した。手術方法としては、手術に際してペントバルビタールを50mg/kg腹腔内に注入し全身麻酔を施行后頭毛を電気バリカンにて剃毛、頭皮を消毒后正中切開を加え左側前頭骨に直径4.0mmのドリルで穿孔、尖刀を挿入して左脳半球前頭葉のみの切截手術を行った。但しこの際出来る限り脳軟膜の血管、中心静脈洞等の損傷を来たさないよう注意して手術を行い、頭皮縫合、Nobectan 噴霧にて創面を密閉して手術を終了した。更に、手術後の感染予防及び栄養目的で体重kg当テラマイシン100mg及び20%糖4mlを術直后1回皮下に投与した。飼育にあたっては鼠用固型飼料(増殖用—MN型オリエンタル酵母社製)を使用した。このように作成された重症外傷脳ratにFig(1)に示す如く、第一群としてデキサメサゾン1mg/kg(第1~第3日目)、0.5mg/kg(第4~第6日目)、0.2mg/kg(第7~第10日目)、0.1mg/kg(第11~第14日目)の暫減投与方法で、第二群はPlacenta抽出物質を1ml/kg・dayとして連続14日間投与を、全く薬剤を投与せず手術のみ施したものを第三群とした。

### 2) 試料の調整

上述のように左脳半球前頭葉に切截手術を施行したratを術后3日目、7日目、14日目、更には1ヶ月以上飼育したものについて断頭脳摘出を行い、損傷のないように脳軟膜・血管を取り除き、脳表に附着する血液を出来るだけ除いた。検体組織の採取にあたって

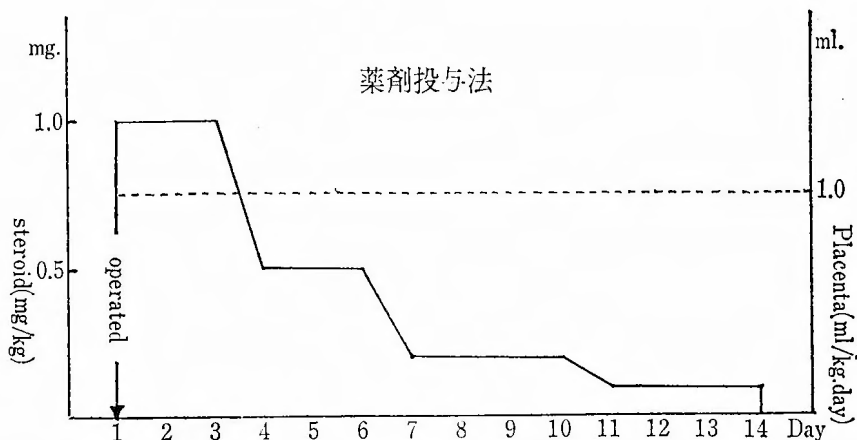


Fig. 1. Steroid 剤 (Dexamethason として) は 1mg/kg の暫減法で Placenta 剤は 1ml/kg・day にて投与。

切截部の前後約 2 mm の範囲の灰白質<sup>10)</sup>を試料として平均約 50~70mg 採取し、対照側として右半球前頭葉の切截部に相対する部位を同様の手技で採取した。

### 3) 水分・電解質の測定

組織内水分量の測定は、採取した試料をあらかじめ重量を測定した 2N+1NO<sub>3</sub> で処理したアルミ箔上に置き可反的速やかに湿重量を測定后、110°C 5 時間以上乾燥し乾燥重量を秤量して湿重量と乾燥重量との差により算出した。また、電解質はこの乾燥組織を一定の 0.01N-HNO<sub>3</sub> で 3 時間抽出し、その抽出液中の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> をベックマン焰分光光度計を用いて測定して電解質量を求めた。

### 4) 遊離アミノ酸の測定

脳組織内の遊離アミノ酸含有量の測定には検体をトーション・バランスで秤量后、4% 過塩素酸液で homogenise し除蛋白後の抽出した上清をアミノ酸自動分析装置を用いて測定した。ペーパー・クロマトグラフィーによる分離定量<sup>12)</sup>の場合は、上記の方法で抽出后東洋濾紙 No. 51, 40×40cm を用いて展開溶媒と

してフェノール：水（4：1）を用いて展開后ニンヒドリンアルコール溶液で発色した。発色後の各スポットを切り取りアルコールで抽出し同一濾紙上に分離された既知のアミノ酸と対比して比色定量した。

### 5) 核酸・蛋白の測定

試料を 4% の過塩素酸で除蛋白し Schmidt-Thaunhauser<sup>13)</sup> の変法に準じて脂質・核酸に分離抽出し RNA を Orcinol<sup>14)</sup> による方法で、DNA を Burton<sup>15)</sup> の方法によって測定した。また、蛋白は Lowry<sup>16)</sup> の変法に準じて測定した。

## III 実験成績

脳組織が外部よりの損傷を受けると、その損傷部位に一致して神経細胞は変性消失し、glia 細胞が反応性に増殖していわゆる gliosis と言われる状態を形成する<sup>8)</sup>。我々も中野<sup>10)</sup>・柴田<sup>11)</sup>等との共同研究で損傷に伴った変化を形態学的に確認しているが、現在臨床的に脳外傷時に於いて広く使用されている steroid 剤や組織代謝賦活剤として応用されている Placenta 抽出

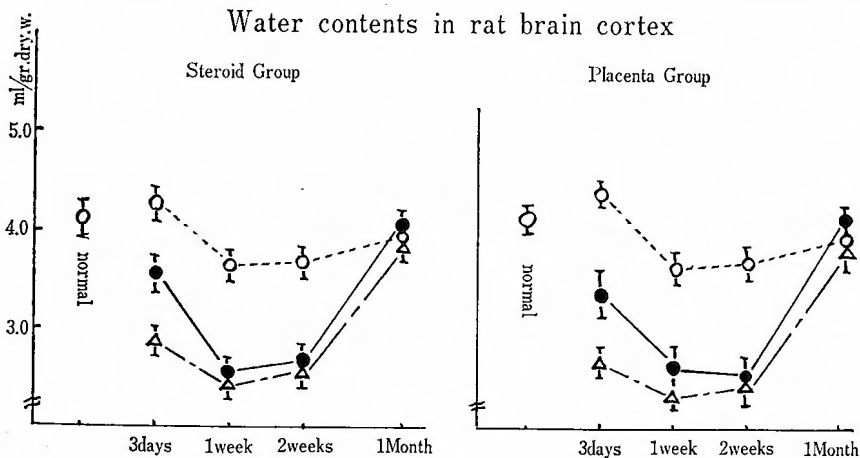


Fig. 2. ○.....○ ope. only. ●——● ope. + inj. △——△ ope. Control

| Conditions   | ope. only ml/gr. dry. w. |           | Steroid inj. ml/gr. dry. w. |           | Placenta inj. ml/gr. dry. w. |           |
|--------------|--------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|------------------------------|-----------|
|              | ope.                     | Control   | ope.                        | Control   | ope.                         | Control   |
| 3 days (7)*  | 4.33±0.21                | 3.89±0.11 | 3.55±0.33                   | 2.80±0.10 | 3.34±0.27                    | 2.65±0.24 |
| 1 week (8)   | 3.71±0.28                | 3.66±0.16 | 2.50±0.45                   | 2.51±0.75 | 2.67±0.35                    | 2.31±0.81 |
| 2 week (8)   | 3.71±0.31                | 3.56±0.16 | 2.73±0.29                   | 2.62±0.38 | 2.58±0.40                    | 2.39±0.53 |
| 1 Month (10) | 3.85±0.15                | 3.75±0.35 | 3.93±0.21                   | 3.88±0.26 | 4.18±0.24                    | 3.92±0.35 |
| normal       | 4.14±0.17                |           |                             |           |                              |           |

\* Experimental numbers were given in parenthesis.

物質等の薬剤を使用した場合、その損傷部位の修復過程で glia 細胞が如何なる影響を受けているか、特に細胞レベルでの生化学的変化に与えている影響を実験的外傷脳により検討した結果次のような成績が得られた。

1) 水分・電解質

損傷を受けた脳組織がその急性期に脳浮腫状態を来とし組織中の水分量は術後3日目で最大値を示すが<sup>10)</sup>、この時期での薬剤非投与群の外傷側でかなりの水分増加を見ているのに対して Fig-(2) に示されるように、steroid 剤投与によりその外傷側での水分増加は非投与群に比べて20%抑制され対照側に近づいている。また placenta 抽出物質投与でも同様に約30%の抑制傾向を認め gliosis の完成された慢性期に至ると共に正常に復している。この事は、損傷を受けた脳組織の浮腫の最も強い急性期に於いて既にこれ等の薬剤の

水分抑制効果が充分認められている。

Fig-(3)(4)は Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> についての変化を示している、Na<sup>+</sup>は急性期に上昇を見ているが steroid 剤の投与により10%以上、placenta 抽出物質投与でも約10%の低下を示しており経時的投与により約二週目頃には殆んど正常にもどっている。K<sup>+</sup>でも同様に極く急性期に於いて両薬剤の投与で外傷側は抑制を示しており steroid 剤では20%以上、placenta 抽出物質では10%以上の抑制を示し、その傾向は1週目迄続き2週目には殆んど正常にもどっている。水分量と同様に電解質も急性期に増加抑制効果が認められている。

2) 遊離アミノ酸

脳組織でのアミノ酸は他の組織に見られるような、単に細胞外からの取り込みと言うだけではなく、組織内で glucose を利用し活発に合成されている<sup>17)-18)</sup>。損傷を受けた急性期での脳組織での遊離アミノ酸につ

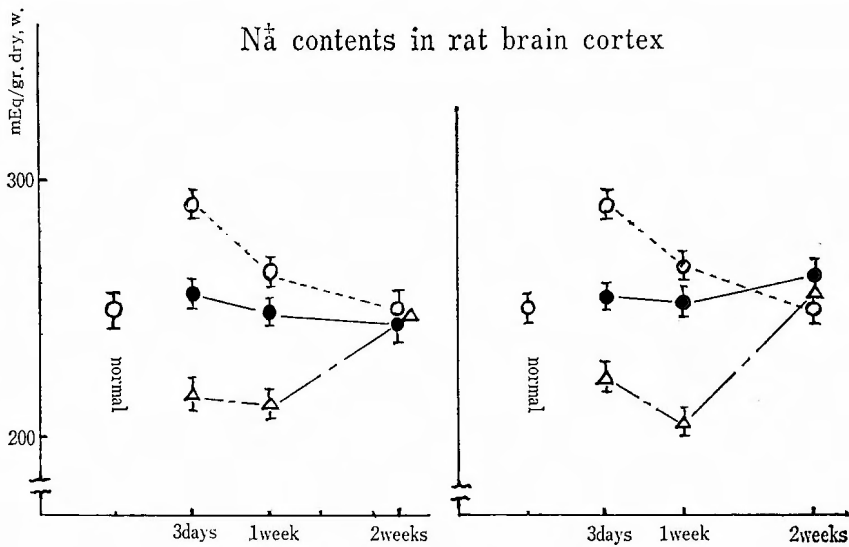


Fig. 3. ○.....○ ope. only ●——● ope.+inj. △---△ ope. control

| Conditions  | ope. only mEq/gr. dry. w. |         | Steroid inj. mEq/gr. dry. w. |         | Placenta inj. mEq/gr. dry. w. |         |
|-------------|---------------------------|---------|------------------------------|---------|-------------------------------|---------|
|             | ope.                      | Control | ope.                         | Control | ope.                          | Control |
| 3 days (7)* | 287±21                    | 236±19  | 254±34                       | 218±21  | 251±28                        | 225±16  |
| 1 week (8)  | 264±12                    | 227±11  | 248±7                        | 213±30  | 252±5                         | 208±51  |
| 2 weeks (8) | 257±13                    | 241±21  | 245±23                       | 251±15  | 268±19                        | 249±37  |
| normal      | 246±19                    |         |                              |         |                               |         |

\* Experimental numbers were given in payentthesis, returned to normal range at the 2 weeks. (焰光分光比色に依る)

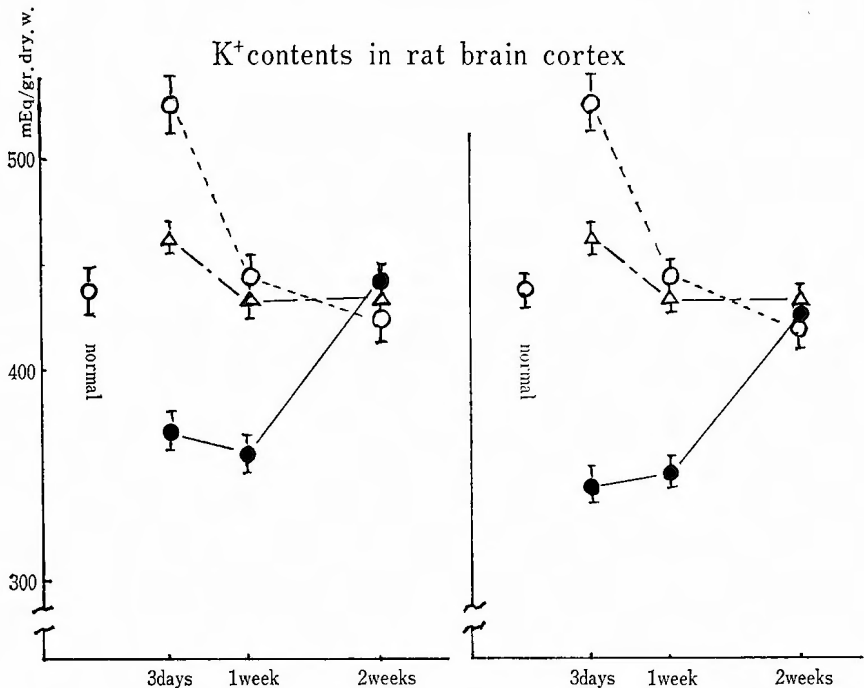


Fig. 4. ○.....○ ope. only ●——● ope. + inj. △— —△ ope. control

| Conditions  | ope. only mEq/gr. dry. w. |          | Steroid inj. mEq/gr. dry. w. |          | Placenta inj. mEq/gr. dry. w. |          |
|-------------|---------------------------|----------|------------------------------|----------|-------------------------------|----------|
|             | ope.                      | Control  | ope.                         | Control  | ope.                          | Control  |
| 3 days (7)* | 531 ± 42                  | 468 ± 37 | 367 ± 38                     | 419 ± 29 | 345 ± 35                      | 334 ± 43 |
| 1 week (8)  | 444 ± 32                  | 444 ± 28 | 360 ± 34                     | 348 ± 30 | 349 ± 29                      | 326 ± 20 |
| 2 weeks (8) | 425 ± 31                  | 463 ± 21 | 469 ± 19                     | 485 ± 23 | 439 ± 11                      | 434 ± 17 |
| normal      | 435 ± 41                  |          |                              |          |                               |          |

\* Experimental numbers were given in parenthesis, returned to normal range at the 2 weeks. (焰光分光比色に依る)

いてみると Fig-(5) でみられる如く薬剤の投与、非投与によらず有意な変化を認めなかった。しかし、慢性期の gliosis の完成された時期に至ると薬剤の投与群でアスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸に関して非常に興味のある変化を示していた。Fig-(6) は1ヶ月以上を経過した実験動物の遊離アミノ酸の変化を示すものであるが、(1)アスパラギン酸の場合、全体の低下を認めるが薬剤非投与群で40%以上の低下を認めるのに対して steroid 剤投与群では約14%の低下即ち26%以上の増加を、placenta 抽出物質投与群でも同様に30%以上の増加を示し殆んど正常に近づいていた。(2)グルタミンでも、アスパラギン酸と同様全体の

低下を認める中で薬剤非投与群及び placenta 抽出物質投与群では余り変化がなく正常に近づいているのに対して、steroid 剤投与群の場合その低下は著明で約60%以上の低下を示して約2倍にも達していた。(3)グルタミン酸について見ると、薬剤非投与群で20%以上の低下を示すのに対して steroid 剤の投与でグルタミンの場合とは逆に50%近く増加を認めて、正常より遙かに増加しているのが判る。また、placenta 抽出物質投与群でも同じように30%近く増加し全く正常に復していた。(4)その他のアミノ酸に関しては全般的に低下傾向を認めたが著明な変化を示していなかった。

### 3) 核 酸

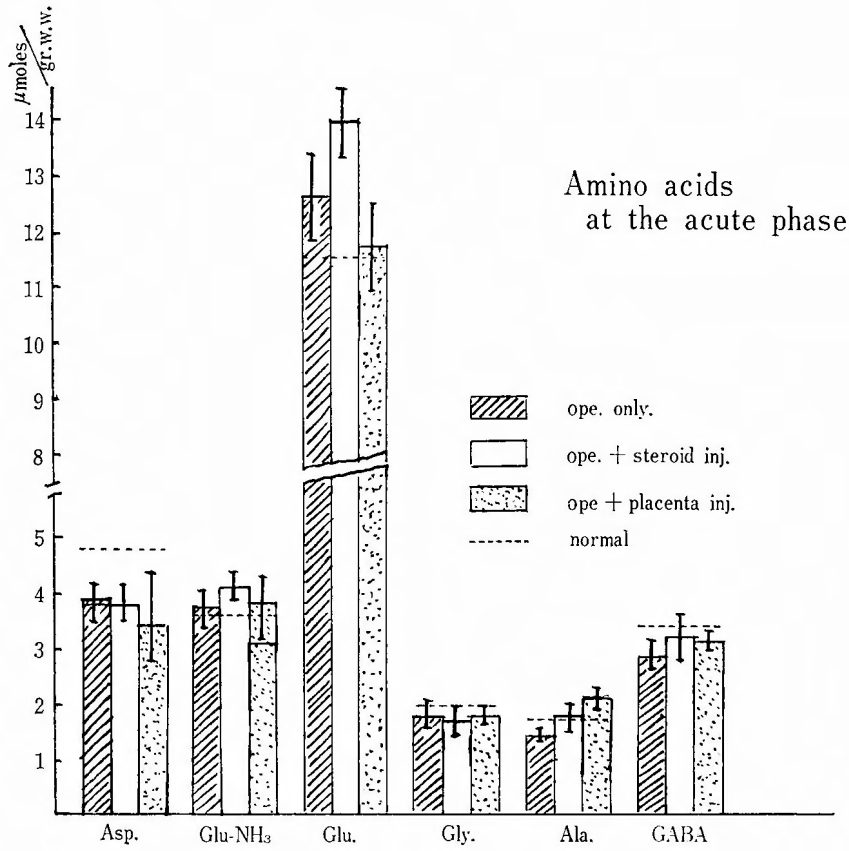


Fig. 5.

| Conditions    |         | Amino acids $\mu\text{moles/gr. w. w.}$ |                     |            |           |           |           |
|---------------|---------|-----------------------------------------|---------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
|               |         | Asp.                                    | Glu-NH <sub>3</sub> | Glu.       | Gly.      | Ala.      | GABA      |
| ope. only     | ope.    | 38.8±0.50                               | 3.75±0.63           | 12.60±2.20 | 1.84±0.30 | 1.46±0.09 | 2.84±0.31 |
|               | Control | 4.22±1.07                               | 3.05±1.78           | 11.44±1.25 | 1.63±0.08 | 1.39±0.03 | 3.28±0.27 |
| steroid inj.  | ope.    | 3.77±0.57                               | 4.07±0.28           | 13.90±1.02 | 1.77±0.34 | 1.83±0.63 | 3.30±0.98 |
|               | Control | 3.20±1.78                               | 2.90±1.59           | 9.20±1.03  | 1.60±0.11 | 1.10±0.56 | 2.50±0.77 |
| Placenta inj. | ope.    | 3.35±1.12                               | 3.75±0.67           | 10.40±1.89 | 2.30±0.14 | 2.15±0.32 | 3.55±0.15 |
|               | Control | 4.40±1.24                               | 2.70±1.06           | 13.60±2.11 | 2.50±0.73 | 1.50±0.33 | 3.00±0.41 |

Amino acids contents in rat brain cortex at the acute phase.

\* Amino acid contents were determined by amino acid autoanalyser. (日本電子 JLC-6AH)

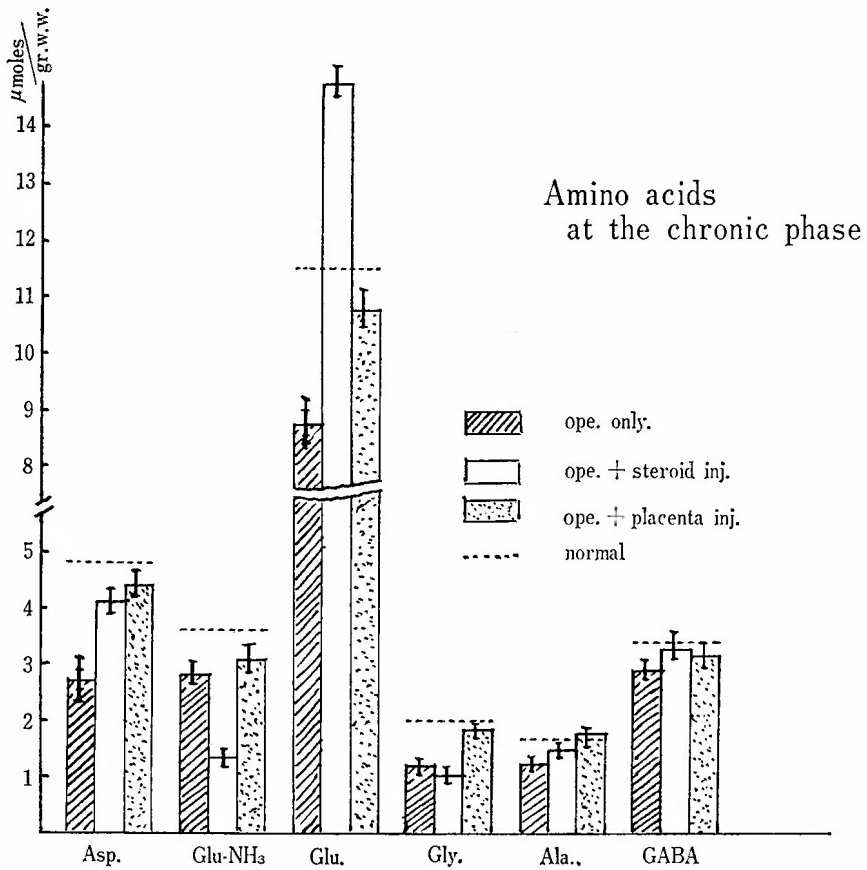


Fig. 6.

| Conditions       |         | Amino acids $\mu\text{moles/gr. w. w.}$ |                     |                  |                 |                 |                 |
|------------------|---------|-----------------------------------------|---------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  |         | Asp.                                    | Glu-NH <sub>3</sub> | Glu.             | Gly.            | Ala.            | GABA            |
| ope.<br>only     | ope.    | $2.72 \pm 0.07$                         | $2.81 \pm 0.09$     | $8.71 \pm 0.61$  | $1.26 \pm 0.27$ | $0.78 \pm 0.19$ | $2.93 \pm 0.08$ |
|                  | Control | $4.76 \pm 0.71$                         | $3.62 \pm 0.77$     | $11.14 \pm 1.23$ | $2.04 \pm 0.14$ | $1.30 \pm 0.11$ | $3.40 \pm 0.17$ |
| steroid<br>inj.  | ope.    | $4.10 \pm 0.41$                         | $1.40 \pm 0.12$     | $14.80 \pm 0.98$ | $1.10 \pm 0.27$ | $1.00 \pm 0.62$ | $3.19 \pm 0.33$ |
|                  | Control | $3.60 \pm 0.17$                         | $3.05 \pm 0.38$     | $12.80 \pm 0.51$ | $1.20 \pm 0.09$ | $2.80 \pm 0.09$ | $3.80 \pm 0.57$ |
| placenta<br>inj. | ope.    | $4.20 \pm 0.33$                         | $3.05 \pm 0.12$     | $11.70 \pm 0.57$ | $1.75 \pm 0.38$ | $1.35 \pm 0.73$ | $3.14 \pm 0.21$ |
|                  | Control | $4.82 \pm 0.27$                         | $3.40 \pm 0.43$     | $13.30 \pm 0.86$ | $2.30 \pm 0.34$ | $2.15 \pm 0.29$ | $3.55 \pm 0.47$ |

Amino acids contents in rat brain cortex at the chronic phase.

\* Amino acid contents were determined by amino acid autoanalyser. (日本電子 JLC-6AH)

蛋白質合成の指標の一助となる核酸中の RNA 含量の変化の特徴は Table (1) A, B及び Fig. (7) に示される如く薬剤の投与により, 術後 3 日目の脳浮腫の著明な時期で既に外傷側と対照側とで全く差がなくなっており, steroid 剤の投与群では 1 週目より, また placenta 抽出物質投与群では 2 週目で各々急激な増加を示してい

る。これに対して薬剤非投与群の場合全く変化がなく推移して慢性期ではその両群の間に差を認めなくなって正常に復していた。他方 DNA について見ると Table (1) A, B 及び Fig. (8) に見られる如く steroid 剤の投与により急性期で外傷側と対照側とに差は殆んどなく, 1 週目迄はむしろ低下を示してそれ以降除

Table 1. A. B

1-A Steroid group

| Conditions   | RNA mg/gr. w. w. |            | DNA mg/gr. w. w. |            | RNA/DNA • Ratio |            |
|--------------|------------------|------------|------------------|------------|-----------------|------------|
|              | ope.             | Control    | ope.             | Control    | ope.            | control    |
| 3 days (13)* | 2.13±0.23        | 2.133±0.15 | 0.623±0.03       | 0.630±0.02 | 3.242±0.81      | 3.519±0.78 |
| 1 week (11)  | 2.109±0.34       | 1.776±0.28 | 0.555±0.12       | 0.490±0.06 | 3.800±0.34      | 3.624±0.51 |
| 2 weeks (11) | 2.704±0.19       | 2.991±0.22 | 0.745±0.07       | 0.589±0.03 | 3.630±0.40      | 5.078±0.60 |
| 1 Month (15) | 2.305±0.20       | 2.304±0.31 | 0.810±0.04       | 0.680±0.04 | 2.845±0.48      | 3.388±0.82 |
| Control      | 1.725±0.19       |            | 0.510±0.14       |            | 3.382±0.32      |            |

1-B Placenta group

| Conditions   | RNA mg/gr. w. w. |            | DNA mg/gr. w. w. |            | RNA/DNA • Ratio |            |
|--------------|------------------|------------|------------------|------------|-----------------|------------|
|              | ope.             | Control    | ope.             | Control    | ope.            | Control    |
| 3 days (13)* | 1.930±0.15       | 1.953±0.09 | 0.654±0.04       | 0.606±0.01 | 2.951±0.41      | 3.233±0.77 |
| 1 week (11)  | 2.899±0.36       | 2.557±0.13 | 0.598±0.10       | 0.636±0.02 | 4.848±0.28      | 4.020±0.62 |
| 2 week (11)  | 2.596±0.22       | 2.475±0.24 | 0.603±0.09       | 0.585±0.07 | 4.305±0.07      | 4.231±0.31 |
| 1 Month (15) | 2.180±0.17       | 2.326±0.10 | 0.791±0.03       | 0.624±0.04 | 2.750±0.50      | 3.720±0.22 |
| Control      | 1.725±0.19       |            | 0.510±0.14       |            | 3.382±0.32      |            |

RNA, DNA and RNA/DNA • Ratio in rat brain cortex

(A) injected steroid (B) injected placenta

\* Experimental numbers were given in parenthesis.

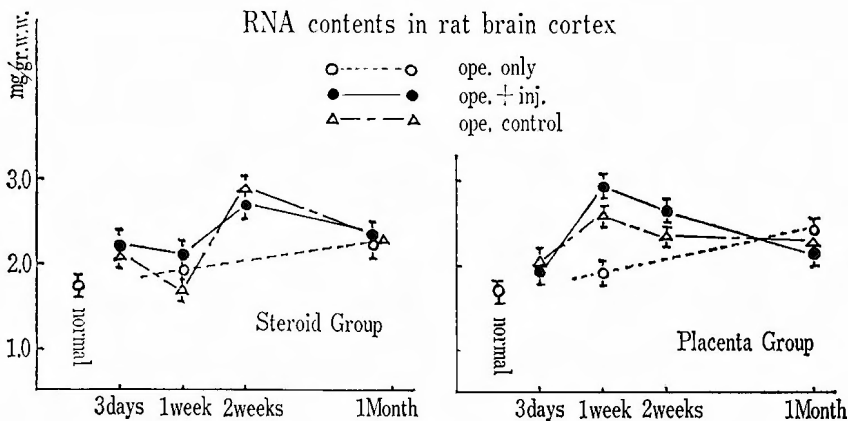
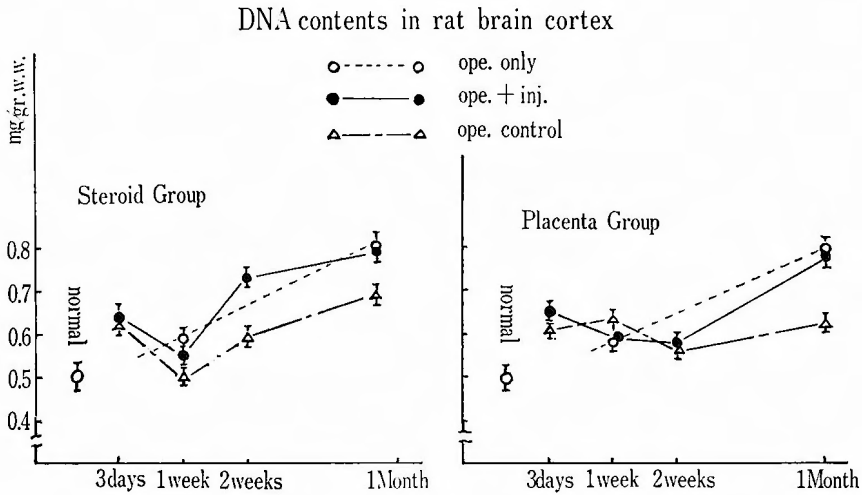


Fig. 7.



増に加を見る。Placenta 抽出物質投与群でも同様に1週目迄少々低下の傾向を示すが、2週目頃より急激な増加を示して gliosis が完成する4週目には明らかに有意の差が認められて細胞増加の起ったことが示唆される。薬剤非投与群では急性期より著明な変化を認めず緩徐な増加であった。

#### 4) 総蛋白量

Table (2) は総蛋白量の推移を示すものであるが、両薬剤の投与群で急性期に於いて外傷側は低値を示すが経時的変化では1週目頃より正常に復して、それ以後はむしろ増加の傾向を示して一定の含有量が維持されていた。

### IV 考 察

損傷脳に於ける特徴的变化は前述したように、脳浮

腫の問題とそれに引き続いて起る神経細胞の変性消失、更には glia 細胞の反応性増殖と言う現象である。現在では脳浮腫が単に「脳組織の水分々布の変化に伴う容積の増大膨化」と言った概念から進んで M-Reichardt<sup>19)</sup>の言うような2つの考えに分類、定義されている。一方、電子顕微鏡の見地からも De-Robertis<sup>20)</sup>, Hartmann<sup>21)</sup>, Luse<sup>22)</sup>等が「細胞外腔や血管周囲腔に液体が貯溜している像は認められず、glia 原形質の電子密度の低下、glia 細胞膜膨化等の所見のみである」と報告しているように形態学的変化が問題となり重要になって来ている。また損傷脳の損傷部位に一致して反応性に増加する glia 細胞 (gliosis) について Bielschowsky<sup>23)</sup>の「単なる瘢痕組織とは異なる」と言う報告以来その役割、増殖機転についても研究されている。以上のような観点に基いて損傷脳での変化――

Table 2. Protein contents in rat brain cortex

| Conditions |      | Steroid inj. mg/gr. w. w. |              | Placenta inj. mg/gr. w. w. |             |
|------------|------|---------------------------|--------------|----------------------------|-------------|
|            |      | ope.                      | Control      | ope.                       | Control     |
| 3 days     | (4)* | 91.98±6.41                | 116.18±9.66  | 101.0±8.52                 | 106.0±17.76 |
| 1 week     | (4)  | 114.0±0.72                | 129.13±13.14 | 115.47±3.51                | 133.57±9.14 |
| 2 weeks    | (6)  | 124.80±3.7                | 128.0±7.3    | 126.6±1.8                  | 132.4±5.4   |
| 1 Month    | (6)  | 134.30±17.13              | 133.74±10.53 | 129.65±14.17               | 147.03±8.99 |
| Control    |      | 115±5.0                   |              |                            |             |

Gliosis protein range was 115±5.0 by experimental data.

\* Experimental numbers of rats.

殊に細胞レベルでの生化学的変化——が現在外傷脳に際して広く臨床的に使われている薬剤によってどのような影響効果を細胞変化の途上で惹起しているかを検討する目的で rat を使って実験的外傷によりその経時的変化を観察した。

薬剤としては steroid 剤 (Glucocorticoid として) と Placenta 抽出物質 (冷蔵胎盤抽出物質として) の2剤を選択し、その根拠としては次のような理由による。(1) steroid 剤が脳浮腫に効果のあることを1945年に Prados<sup>24)</sup> が注目して以来諸家の認めるところとなり、現在臨床的に広く応用され充分利用されて来ている。しかし、その効果が外傷脳治癒経過の上で如何なる作用効果をもたらしているかについては今尚、明らかになっていない。(2) placenta 抽出物質については W. P. Filatow<sup>25)</sup> の定唱する「生体原刺激素としての作用によるジストニー及び代謝障害の平衡維持と正常促進」と言う根拠に基いて、人胎盤を低温処理 (2℃～4℃, 7日間) 后酵素分解を行ない、有効成分を冷所に貯蔵され chamberland の濾過器を通して滅菌精製されたもので、その組成は Table (3) に

Table 3. Placenta 剤組成

|                             |                   |
|-----------------------------|-------------------|
| 総 窒 素                       | 78mg/100ml        |
| 総 蛋 白                       | 0.49～0.52gr/100ml |
| ア ル ブ ミ ン                   | 22.5%             |
| 総 グ ロ ブ リ ン                 | 77.5%             |
| $\alpha_1 + \alpha_2$ グロブリン | 9.5%              |
| $\beta$ -グ ロ ブ リ ン          | 55.5%             |
| $\gamma$ -グ ロ ブ リ ン         | 12.5%             |

示される如くであるが、実際に副腎皮質ホルモンやこれに類似のホルモン更には副腎皮質刺激ホルモンの存在の証明等が明らかにされている。このような薬剤の使用により「組織代謝促進をはかり細胞賦活作用の著明な働き」と言う報告が見られるが、損傷を受けた脳組織及び反応性に増殖する glia 細胞に対しては、如何なる効果が示されてるかを検討する目的で上記の2剤を選択使用した。また、今回の実験報告で電解質中 Cl<sup>-</sup> の移動に関しては、glia 細胞の変化、代謝の変化との関連性が稀薄のため割愛した。

1) 水分・電解質について

水分・電解質については、諸家の報告<sup>26)～29)</sup> にも見られるように急性期の外傷脳に於いて共に平行的に増加するが、我々の方法による実験的重症外傷脳でも同様の結果を得ているが Fig. (2)(3) に示されるように水

分、Na<sup>+</sup> は Steroid 剤投与により各々約20%, 10%以上 Placenta 抽出物質投与でも約30%, 10%の抑制効果を早期より認めている。K<sup>+</sup> では極く急性期に於いて一過性に上昇を見るが Fig. (4) これは実験方法で水分重量として測定している為、その測定方法及び操作過程に於ける Blood の含有と言う事も考慮に入れなければならない。いずれにせよ、薬剤非投与群に比べて著明な効果を認めてかつ対照側に近似した値を示して約2週目頃迄その低下傾向は続き既に完全に正常に復している。このように急性外傷脳に於いて早期より水分・電解質が抑制効果を示すことは、外傷脳のような脳浮腫の場でのいわゆる血液脳関門が破壊された状態即ち実験的外傷浮腫脳の電子顕微鏡の見地で細胞外腔や血管周囲腔に液体成分の貯溜が見られず glia の原形質膜の電子密度の低下、glia 細胞膜の増大膨化と言った血液脳関門での血管内皮膜や glia 細胞膜の選択的透過性のバランスが失われた状態で、これ等の両薬剤がこの破壊された血液脳関門に直接的に働きかけて膜の透過性に関する機能修復に効果をもたらしているものと考えられる。この事は、逆に慢性期での状態を観察する時周知のように gliosis の形成されてしまった時期での P<sup>32</sup> を使っての脳組織への取り込み実験で対照側と殆んど差がなくなっている<sup>10)</sup> ことでも判るよう物質の transport の面で破壊された血液脳関門への両薬剤の効果が glia 細胞の増殖により修復改善された膜の透過性と同じように働きかけていると推測され得るのではないだろうか。

2) 遊離アミノ酸について

正常の脳組織中の遊離アミノ酸は、他臓器に比べ極めて高濃度に特異的に存在しているが、これは glucose より生合成が非常に高いこと、脳組織の遊離アミノ酸の組成の特異性<sup>30)31)</sup>、更にまた血液脳関門の存在等が複雑に絡み合って出現している一連の現象である。特に脳組織中の遊離アミノ酸組成ではグルタミン、グルタミン酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸が大半を占めるが、中でも  $\gamma$ -アミノ酪酸、N-アセチルアスパラギン酸等は脳組織中に多量に見られる。これ等のアミノ酸は glucose の代謝過程で酸化によりクエン酸回路の中間代謝産物から産生されることは C<sup>14</sup>-Glucose を使用しての実験報告でも明白な事実となっている。しかし、中野<sup>10)</sup>・柴田<sup>11)</sup>等の報告にも見られたように損傷脳でのアミノ酸含量は、その急性期に於いて対照側との有意な差を殆んど認めていなかったのに対して、本実験で示されるように慢性期の gliosis の完成した

後の組織では Fig. (6)に見られる如く各アミノ酸は全て低下傾向にあり glia 細胞のアミノ酸代謝の特徴を示唆している。Hydén<sup>32)</sup>, Rose<sup>33)</sup> は単離 glia 細胞で遊離アミノ酸組成が神経細胞に於ける態度と異なることを報告しており、また柴田<sup>11)</sup>が報告した如く解糖系の酵素活性も異なること、更には gliosis 組織で認められたアミノ酸組成への C<sup>14</sup>-glucose のアミノ酸への組み込み実験で我々の教室の中野<sup>10)</sup>が指摘しているようにアミノ酸代謝回転の亢進状態と言う事実等より考えると、glia 細胞は神経細胞とは明らかに異ったアミノ酸代謝を行っていると考えられる。一方、薬剤を使用しての本実験成績を検討すると遊離アミノ酸の低下の中で興味ある変化があった。即ち Fig. (6)に見られるように全般的低下傾向のある中で steroid 剤投与群でアスパラギン酸、グルタミン酸の増加を、グルタミンの著明な低下が見られ、placenta 抽出物質投与群では殆んど正常に近づいて来ている。Gliosis が完成された代謝回転の異ったパターンの中でこのようにアミノ酸組成に変化を示すのは、これ等の薬剤が生化学的に何等かの影響効果を与えているものと考えられる。殊に steroid 剤を投与することによって急性期の損傷脳での血流の低下、局所の anoxia の出現した早期の時点で、細胞膜の透過性亢進を正常化し、障害を受けた血液脳関門機構の改善に働きかけることは既に良く知られたことである。しかし、steroid 剤が今日迄報告されて来ている急性期での脳浮腫に対する作用以外に、細胞レベル特に glia 細胞のアミノ酸代謝でのこのような著明な変化をもたらしたことは注目すべき現象である。これは steroid 剤が1つには glia 細胞でのアミノ酸代謝回転の中でグルタミン合成酵素に阻害的に働き、グルタミン酸増加とアスパラギン酸の増加促進を引き起しているとも考えられる。あるいは、Questel<sup>34)</sup>等の言うグルタミン酸の酸化能を速めて別の代謝回転 GABA-shunt を亢進させグルタミン合成を低下させることで RNA, DNA 合成, gliosis の glia 細胞の生命維持を創り出しているのかも知れない。更にまた、急性期に steroid 剤が作用し脳浮腫の状態が軽減されたことで損傷を受けた神経細胞が修復を速め、その結果遊離アミノ酸が全般的に正常に近づいたのかも知れない。Placenta 抽出物質を投与した場合でも既に完成した glia 細胞内で placenta 剤特有の生体刺激効果としての作用機序が組織代謝を賦活化し、gliosis でのアミノ酸代謝生合成の一助を担ったのではないだろうか。あるいは、placenta 抽出

物質中に証明されている副腎皮質ホルモン系統の発現の為の現象かも知れない。いずれにせよ、このようにグルタミン合成系を抑制して gliosis でのアミノ酸代謝に変化を示したことは、今日迄血液脳関門に関してのみ働くと考えられていた steroid 剤や Placenta 抽出物質が細胞レベルでの脳代謝面に関しても明らかに効果を示していることを示唆したものである。従ってこれ等に関連する酵素系を検討することにより、そのメカニズムが一層解明され得ると考える。

### 3) 核酸について

細胞構築としての指標になる RNA, DNA の経時的変化は実験成績 Table (1) A, B 及び Fig. (7)(8)に示したように、薬剤を投与した場合の RNA の変化は steroid 剤投与群では約2週目に、placenta 抽出物質投与群では約1週目と時間的差はあるが共に増加して gliosis 形成の最も盛んな5日目~14日目頃迄に一致しており、これは gliosis 完成と共に正常に復していた。薬剤非投与群と比較する時、両薬剤が glia 細胞の増殖期に著明な増加を示し RNA 合成に促進的に働きかけて蛋白合成を促していることを示唆している。DNA は約1週目に一時的軽度の低下を示すがその後徐々に上昇を続けて1ヶ月以上の gliosis の完成した時期になると、薬剤非投与群と比較して著明な変化を認めなかった。

RNA, DNA の相関を見ると RNA/DNA・RATIO は減少の傾向を示して細胞の増加状態を認めるが慢性期以降では一定化して細胞増殖が終り、gliosis の完成されたことが推測出来る。DNA で認められる1週目頃迄の減少とそれに続く急激な増加と言う現象は、脳組織で認められる lysosom 酵素の DNA 分解酵素が同時期に著明に活性化され、数日遅れて DNA 合成酵素が活性化される報告<sup>35)</sup>と本実験での結果と合致する。しかも steroid 剤が DNA 分解酵素と合成酵素のピークの遅れを in vivo では一層助長するとの報告<sup>36)</sup>もあり本実験での steroid 剤効果とも一致している。従って、損傷脳での急性期からのこれ等の薬剤の投与は1~2週目の細胞分裂の盛んな時期に RNA は増加を認め、遊離アミノ酸の代謝回転の特異なパターンと考え合すると興味深い相関々係を示している。

### 4) 総蛋白量について

総蛋白量について検討すると Table (2)で見えるように両薬剤の投与群で急性期に一過性の低値を示しているが、1週目では既に正常に回復して経時的に慢性期に至る迄顕著な増加が認められ、我々の教室の中野<sup>10)</sup>

報告ではこの一過性の減少は見られなくむしろ高値を示していた。恐らく浮腫の著明な時期での代謝の低下に起因しているものと思われる。しかし、両薬剤の投与による減少現象は薬剤の影響であろう。即ち損傷脳の急性期での薬剤効果としての細胞膜の透過性の改善、水分の抑制と同時に細胞内の蛋白量の減少等で一過性の低下を示したのではないかと思われる。次いで膜の透過性の修復と平行して脳組織での蛋白合成は、その前駆物質としての遊離アミノ酸の存在を必要とするが損傷脳での核酸合成にみる RNA, DNA の経時的推移と慢性期 gliosis に於いて示されたアスパラギン酸やグルタミン、グルタミン酸を中心としたアミノ酸代謝の特異的生化学的代謝パターン等が一連の歯車となって蛋白合成を促進した結果、その増加を示したものであろう。

以上4項目の検討の結果、glia細胞がsteroid剤やplacenta抽出物質に依って水分・電解質により正常化に、また遊離アミノ酸、核酸、蛋白等がアミノ酸代謝を介して明らかに影響を受けていることが判明した。

## V 結 語

損傷脳での薬剤効果と言う観点によりその急性期より経時的に今日広く使用されているsteroid剤、placenta抽出物質等を投与し細胞レベルでの生化学的変化を幾つかのFactorから実験的外傷脳を用いて実験観察し検討を加えて次のような結論を得た。

(1) 両薬剤の投与で急性期に見られる脳浮腫は明らかに抑制されており、水分のみならず電解質をより正常化の方向に影響していた。

(2) 遊離アミノ酸をはじめ、核酸、総蛋白量の三者にも薬剤の効果を認めた。即ち、アミノ酸の代謝能を変え核酸、蛋白合成系に促進的な効果を示していた。

本文の要旨は第33回日本脳神経外科学会に於いて発表した。稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師栗津三郎教授ならびに生化学的御指導を賜った第2生理学教室平野修助教授に深謝の意を捧げます。また、日々御援頼達を戴いた第2外科教室中野重徳博士、柴田家門博士に感謝申し上げ、第2外科教室員の方々に厚く御礼の意を表わします。

## 文 献

- 1) Luse, S. A. & Harris, B.: Electron microscopy of the Brain in experimental edema. *J Neuro-surg* **17** : 439, 1960.
- 2) Bakay, L.: Studies on Blood-brain-barrier with radioactive phosphorus. V. Effect of cerebral injuries and infarction on the barrier. *Arch Neural and Psychiat* **73** : 2-13, 1955.
- 3) Eugen Stern, W. : Studies in experimental brain swelling and brain compression. *J Neurosurg* **16** : 676-704, 1959.
- 4) 石井昌三: 血液脳関門について. *脳と神経* **14** : 357-361, 昭32.
- 5) Prados, M., Strower, B. and Feindel, W. H. : Studies on cerebral Edema. I. Reaction of Brain to Air Exposure. Pathologic changes. *Arch Neurolog Psychiat Chicago* **54** : 163-174, 290-300, 1945.
- 6) 西本 詮: 脳浮腫の研究. *脳と神経* **14** : 363-366, 1962.
- 7) 栗津三郎: 脳浮腫. *外科* **26** : 77-80, 昭39.
- 8) Caijial, S. & Ramon, Y. : Degeneration in the nervous system. 2 vols. transl. from Spanish ed. of 1913. Oxford Univ press London : Humphrey Milford 1928.
- 9) Sigurd Rauch, Robert Zeuden & Annemarie Kostlin : 胎盤エキスの生化学. *Helvetica Medicad Acta* **23** : 1-22, 1956.
- 10) 中野重徳: 外傷脳の生化学的研究, *日本外科宝函* **37** : 1 : 177-187, 1968.
- 11) 柴田家門: 損傷脳に発生する反応性グリオース組織の生化学的研究. *脳と神経* **25** : 329-336, 1973.
- 12) 塚田裕三, 永田豊: ペーパークロマトグラフィーによる脳組織遊離アミノ酸の分離定量法について, *生化学* **33** : 51, 昭36.
- 13) Hutchinson, W. C. & Munro, H. N. : The Determination of Nucleic acids in Biological Materials. *Analyst* **86** : 768-808, (1961)
- 14) Dishe, Z. : In the Nucleic Acid (ed. Chrgaff, E., Davidson, J. N.) **1**, p. 300 Academic Press 1955 .
- 15) Burton, K. : A study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Biochemical J* **62** : 315-323, 1956.
- 16) Lowry, O. H., Leiner, K. Y., Wu, M. & Farr, A. L. The Quantitative Histochemistry of Brain. *J Biochem* **207** : 1-17, 1954.
- 17) 塚田裕三: 脳の生化学. 朝倉書店 1969.
- 18) 高木広敏, 三浦義彰: 核酸. 朝倉書店 1970.
- 19) Reichardt, M. : Zur Entstehung des Hirndruckes. *Deutsch Z Nervenheilk* **28** : 306-355, 1905.
- 20) De Robertis, E. : Some old and new concepts of Brain structure. *World Neurology* **3** : 98-110, 1962.

- 21) Farquher, M. G. & Hartmann, J. F.: Neuroglial structure and relationships of revealed by electron microscopy. *J. Neuropath. Exp Neurol* **16**: 18-39, 1957.
- 22) Luse, S. A. & Harris, B.: Electron microscopy of the Brain in experimental edema. *J J Neurosurg* **17**: 439, 1960.
- 23) Bielschowsky, M.: *Allgemeine Histologie und Histopathologie des Nerven systems*. Bumke u. Foerster's *Hadbuch de Neurol*. Bd. 1, Springer, Berlin 1935.
- 24) Prados, N., Strowger, B. & Ferndel, W. H.: Studies on cerebral edema. *Arch Neurol Psychiat Chicago* **54**: 163-174, 290-300, 1945.
- 25) Filatow, W. P.: Nachweis der Aktivität von Gewebesextrankten nach Filatow. Von Dr. Ingrid weis. *Helvetica Medica Acta* **23**: 92-93, 1966.
- 26) 佐野圭司, 畠中担: 脳浮腫のステロイド療法, 最新医学 **18**: 2478-2492, 昭38.
- 27) 荏原光夫: 脳浮腫の生化学的研究. 日本外科宝函 **33**: 314-328, 昭39.
- 28) 畠中 担: 脳浮腫と Blood-BrainBarrier. 医学のあゆみ **64**: 688-697, 昭43.
- 29) 半田 肇, 谷 栄一: 脳浮腫の最近の問題. 日本臨床 **23**: 132-145, 1965.
- 30) 塚田裕三: 脳の生化学. 中枢神経実験法 生化学編
- 31) 高木広敏, 三浦義彰: 核酸 (朝倉書店)
- 32) Hydén, H.: Dynamic aspects on the neuron-glia relationship. A study with microchemical method. "The Neuron" (ed. Hydén, H.) 179-219, 1967.
- 33) Rose, S. P. R.: Preparation of enriched fraction from cerebral cortex containing isolated metabolically active neuronal and glial cells. *Biochem J* **102**: 33-43, 1967.
- 34) Parmer, S. & Wastel, J. H.: "Biochemistory of the central nervous system" 40, Pergamon Press 1959.
- 35) 野口鉄也, 須田治彦: ラット大脳の酸性DNA分解酵素の性質. 神経化学 **12**: 64-67, 1973.
- 36) 須田治彦, 野口鉄也: 脳組織のDNA合成酵素について. 神経化学 **12**: 52-55, 1973.