STUDIES ON FREE AMINO ACIDS AND C-REACTIVE PROTEIN
IN PERILYMPH OF GUINEA PIGS

By

YUTAKA SAKAMOTO

*From the Department of Oto-Rhino-Laryngology, School of Medicine
Keio University, (Director: Y. Suzuki)*

Free amino acids and C-reactive protein in the perilymph and cerebrospinal fluid of guinea pigs was analysed and the following results were obtained.

1) Under normal condition, seven free amino acids: glutamine, alanine, threonine, glycine, serine, glutamic acid and aspartic acid were found in the perilymph.

2) By soft palate irritation, four other amino acids which were never seen in the normal, appeared in the perilymph. They were cysteic acid, arginine, histidine and lysine.

3) Free amino acids normally seen in the cerebrospinal fluid of guinea Pigs were: glutamine,

alanine, threonine, glycine, serine, glutamic acid, aspartic acid, arginine, histidine, lysine, valine and leucine.

On the contrary to findings of the perilymph, no change was noticed in the composition of amino acids in the cerebrospinal fluid by soft palate irritation.

4) Furthermore, C.R.P. of the perilymph, cerebrospinal fluid and blood serum was also investigated. It's appearance was observed by soft palate irritation while it was negative under normal condition.

モルモット外リンパ液の遊離アミノ酸
及び C.R.P. に関する研究

慶応義塾大学大学院医学研究科外科系耳鼻咽喉科専攻（指導：鈴木安恒教授）

坂 本 裕
さか もと ゆにか

目 次

第1部 正常時モルモット外リンパ液の遊離アミノ酸について

- 第1章 緒 言
- 第2章 実験方法
- 第3章 実験結果
- 第4章 総括及び考按
- 第5章 結 語

第2部 口蓋刺激時モルモット外リンパ液の遊離アミノ酸について

- 第1章 緒 言
- 第2章 実験方法
- 第3章 実験結果
- 第4章 総括及び考按

第5章 結 語

第3部 モルモット髄液の遊離アミノ酸について

- 第1章 緒 言
- 第2章 実験方法
- 第3章 実験結果
- 第4章 総括及び考按
- 第5章 結 語

第4部 モルモット外リンパ液、髄液、血清中の C.R.P. について

- 第1章 緒 言
- 第2章 実験方法
- 第3章 実験結果
- 第4章 総括及び考按
- 第5章 結 語

参 考 文 献

第1部 正常時モルモット外リンパ液の遊離アミノ酸について

第1章 緒 言

内耳液は音響刺激を外界から聴覚受容器へ伝達する媒体として、又内耳物質代謝における transmitter として、極めて重要な役割を演じていることは云うまでもない。したがって種々の内耳疾患の病因を追究するためには、この内耳液の生化学的研究は不可欠の問題である。

しかしながら、検体を得ることの困難さと、そのあまりの微量さにさまたげられて、この問題はかなり古くから注目されているにもかかわらず、なお充分な成果が得られていない。

ここに私は比較的微量にて測定し得られ、かつ内耳物質代謝の重要な一環をなすと考えられる遊離アミノ酸を一つの指標として選り、種々の条件下におけるその消長から内耳の動的機構の一端をさぐろうと試み、その第一段階としてまず正常モルモットの外リンパ液遊離アミノ酸の測定を行つた。

第2章 実験方法

実験動物として体重 300～400g、主に雄性のアルビノモルモットを用いた。その際特に鼓膜所見正常、ブライエル反射正常のもののみを選んだ。

なほ、内耳液中、内リンパ液はアミノ酸の分析を行うに足る量を得るためには20匹以上の動物を用いねばならず、実験に適さないので今回は比較的多量に採取し得る外リンパ液のみを対象とした。

外リンパ液の採取に当つては、Aldred et al²⁾, Rüedi⁴²⁾, Smith et al⁴⁷⁾, 松生³¹⁾らによる記載を参考として行つた。即ち実験動物を麻酔後断頭、急速に失血死せしめ、中耳骨胞を開放し、鼓膜を破り耳小骨を除去し、先端直経約 0.1mm の毛細管ピペットを用いて、双眼実体顕微鏡下に正門窓より外リンパ液を採取する。毛細管ピペットはマイクロマニプレーターに装着するが、慣れれば直接手を用いて行うことも可能である。この際先端は深部にまで刺入せず毛細管現象により自然に吸引させる。血液による汚染のおそれあるものは破棄した。

このようにして採取し得る外リンパ液は1耳平均約 3mg である。この5頭10耳分約 30mg を1回の実験に供した。

動物の麻酔方法、殺害方法の外リンパ液組成に対する影響の有無を知るために、無麻酔、エーテル麻酔、ウレタン麻酔の群、又断頭死、心臓穿刺失血死、冷凍死の群についてそれぞれ比較検討した。

なおウレタン麻酔は25% ウレタン溶液約 2cc 腹腔内注射、冷凍死は -60°C のドライアイスアルコール液中投下によるものである。

採取した量の測定は重量法により行つた。即ち 0.1mg まで計量しうる島津製電気秤により採取した毛細管ピペットごと測定し、外リンパ液をとり出し後再びピペットの重量を測定し、その差を採取した外リンパ液の量とした。

このようにして採取、計量された外リンパ液の遊離アミノ酸を二次元ペーパークロマトグラフ法により測定した。

測定に用いた濾紙は東洋濾紙製 No. 51 二次元用 40cm×40cm のものである。この濾紙の一端に温風で乾かしながら試料をそのままスポットした。この程度の量、濃度では特に除蛋白その他の処理は必要としない。

展開溶媒としては4:1のフェノール:水及び4:1:1のブタノール:醋酸:水をそれぞれの次元に用いた。試薬は市販の特級品ならばそのままでも使用に堪えるが、フェノールのみは再蒸留を行つた方が好結果が得られる。

この溶媒をそれぞれ専用の装置(東洋濾紙製ペーパークロマトグラフィーキャビネット E-IP)中に充たし、上昇法によりまずフェノール次元において約12～18時間展開し、約30cm 浸透した濾紙を48時間以上風乾、完全に乾燥させ、次いでブタノール次元にて同様約12～18時間前者と直角に交叉する方向に展開する。そしてこれを約2時間乾燥させ、次いで0.2% ーンヒドリン・エチルアルコール溶液に浸し、乾燥後65°C の hot plate にて30分間加熱発色させる。発色させた濾紙はまもなく褪色するので10% 硝酸銅を散布、固定すれば保存に便利である。

展開温度は室温とした。恒温装置はかえつてむらが生じるため好ましくない。冬期はさけたため特に実験結果に支障はきたさなかつた。

このようにして展開、発色させたアミノ酸は、1回の実験毎に温度その他の条件の差によつて RF に微妙な差を生ずるので、正確を期するため両端に一次元で展開させた標準アミノ酸と比較しながら定性を行つた⁵⁶⁾。

第3章 実験結果

濾紙上に現れたアミノ酸は、第1表に見られるごとくほとんど全例において次の7種である。すなはちグルタミン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸である。表中十は明瞭に、十は痕跡、一は認め得なかつたことを意味する。

第1表 正常モルモット外リンパ遊離アミノ酸

実験番号	mg	グ	ア	ス	グ	セ	グ	ア	シ	ア	ヒ	リ	備考
		ル	ラ	レ	リ	ル	ス	ス	ス	ス	ス	ス	
		タ	オ	ニ	シ	ミ	ギ	ン	ン	ン	ン	ン	
		ン	ン	ン	ン	ン	酸	酸	酸	—	—	—	
19	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	断頭死
20	38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ク
21	35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ク
22	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ク
30	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ク
33	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ク
37	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	心臓穿刺
38	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	冷凍死

これらは 25mg～50mg の範囲ではほとんど結果に差はみられないが、20mg 以下の量では明瞭に出現するのはグルタミンのみで、その他はほとんど判定不能となる。又定量的分析は行はなかつたが、私の方法で検出し得る絶対量がグルタミンで約 0.1 γ 、その他のアミノ酸は約 0.2～0.3 γ であつたことから見てほぼその量を推測し得る。

また前章にのべたごとく試料採取法の影響を各方法について検討してみたが、第1表備考に示すごとく全く結果に差を認めなかつた。

第4章 総括及び考按

以上私はモルモット外リンパ液から7種類の遊離アミノ酸を検出した。

内耳液の遊離アミノ酸については系統的に分析を行ったのは吉川⁶⁸⁾(1955)を嚆矢とするが、その後松生³¹⁾(1957)、Chevance⁷⁾(1958)による報告が見られる。しかしながら吉川、松生等は一次元ペーパークロマトグラフ法を用いたため2～4種のアミノ酸を分析したに止まっている。その後 Chevance⁷⁾はモルモット外リンパ液についてグルタミン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、グルタミン酸の6種を分析しており、私の

今回の成績もほぼこれに近い結果を示している。

さて、これらのアミノ酸が有する意義については全く知られていないが、その組成は血漿、髄液のそれに類似していることが知られる(第2表、第3表)。モルモット

第2表 正常人血漿中遊離アミノ酸

ア	ラ	ニ	ン	2.6～5.3mg/100ml
ア	ル	ギ	ニ	1.1～3.5
ア	ス	パ	ラ	ギン酸 0.9～1.2
シ	ス	テ	イ	ン 0.8～2.0
グ	ル	タ	ミ	ン酸 0.6～1.7
グ	リ	シ	ン	1.3～2.3
ヒ	ス	チ	ヂ	ン 1.1～1.8
イ	ソ	ロ	イ	シ 1.0～2.2
ロ	イ	シ	ン	1.3～2.5
リ	ジ	ン		2.1～3.8
メ	チ	オ	ー	ン 0.3～0.6
フ	エ	ニ	ール	アラニン 0.5～2.2
ブ	ロ	リ	ン	2.4～2.7
ス	レ	オ	ニ	ン 1.1～2.9
ト	リ	プ	ト	フ 0.7～1.5
チ	ロ	ジ	ン	0.8～2.2
バ	リ	ン		2.2～3.5

第3表 正常人髄液中遊離アミノ酸

ア	ラ	ニ	ン	0.21mg/100ml
ア	ル	ギ	ニ	0.1
シ	ス	テ	イ	ン 0.02
グ	ル	タ	ミ	ン 0.73
グ	リ	シ	ン	0.03
ヒ	ス	チ	ヂ	ン 0.05
イ	ソ	ロ	イ	シ 0.01
ロ	イ	シ	ン	0.01
リ	ジ	ン		0.05
フ	エ	ニ	ール	アラニン 0.02
ス	レ	オ	ニ	ン 0.03
チ	ロ	ヂ	ン	0.01
バ	リ	ン		0.02

第4表 諸動物脳中遊離アミノ酸 (55)

	グルタミン酸	グルタミン	γ アミノ酪酸	アスパラギン酸	アセチル アスパラギン酸
ネ	8.7～9.9	5.3	2.2～4.2	2.2	6.0
ネ	8.2～12.8	2.1～6.4	2.0～6.1	1.7～2.8	4.3～6.9
ニ	9.9～10.8	1.9～4.1	2.7～6.0	2.5～3.8	2.6～5.9
ハツカネズミ	11.5～17.5	4.9	3.5～5.9	(μ moles/g)	5.3

トの数値は知られていないので人間の場合と比較した。

このことは神経系特に脳組織中に存在する遊離アミノ酸がグルタミン酸を中心とする分布を示すことに対比すると興味深い (第4表)。

これに関連して私は外リンパ液中には上記の条件下では γ -アミノ酪酸は検出し得ないことをたしかめた。これらのことから外リンパ液の関与する範囲において内耳のアミノ酸代謝は脳神経系のグルタミン酸代謝とは別個の過程においてなされているであろうことが想像される。将来内リンパ液中の遊離アミノ酸の分析が成功すればこの意味においても極めて興味ある知見を加え得ることになるであろう

脳においては太い栄養血管が豊富に存在して活発な脳代謝をまかなっているが、Corti 器はそれ自身の血管を

有していないため、栄養の供給はもつばら内耳液にたよることになる。このことが内耳に代謝障害をきたし易い原因の一つになつているとも考えられる。それ故に内耳液の生化学的研究は内耳物質代謝の研究には欠くことのできないものである。そして Tonndorf⁵⁰⁾ の述べるごとく tunnel 中を充たす液が内リンパではなく外リンパ性のものであるとすれば、外リンパは内リンパ同様直接内耳代謝に参加していることになると云えよう。

第5章 結 語

以上私はモルモット外リンパ液の遊離アミノ酸を二次元ペーパークロマトグラフ法によつて分析し、グルタミン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸の7種のアミノ酸を検出した。

第2部 口蓋刺激時モルモット外リンパ液の遊離アミノ酸について

第1章 緒 言

Koch 以来数10年間、医学の主流は疾病の一次的追究にあつたが、近年ようやくその傾向を脱し、より多角的な視野に立つた研究が行はれるようになった。その一つのさがけとなつたのが Ricker⁴¹⁾, Speransky⁴⁹⁾, Reilly³⁹⁾, Selye⁴⁶⁾, 更には Laborit²⁵⁾ 等による研究である。

一方私の教室では、扁桃摘出術中のショックの問題が端緒となつて、飯田¹⁴⁾, 深沢¹⁰⁾ 等によりモルモットの口蓋に刺激が加えられた時におけるショックに関する研究が行はれ、このショックが上にのべたような先覚者達によつて指摘された自律神経系、あるいは下垂体副腎系を主体とした生体反応によるものであることを発表している。

その後我が教室においてひきつづき行はれた一連の研究^{15) 16) 24) 34) 36) 56)} の結果、口蓋には豊富に自律神経が分布しており、ここに加えられた刺激は自律神経を介して遠隔の臓器や組織につたわり、血管系を主体とする変化をひきおこすものであり、この変化は J. Reilly³⁹⁾ の所謂過剰刺激症候群に一致するものであることがたしかめられた。

更に Chevance^{7) 8)} は同様の方法によつて外リンパ液の組成に変動をきたすことを述べているので、私は口蓋刺激によつて全身に惹起されるであろう変化の一部としての外リンパ液の変動を、遊離アミノ酸の組成の変動をその指標として追究せんと試みた。

第2章 実験方法

実験動物は第1部にのべたと同様のモルモットを用いた。

口蓋刺激の方法としては我が教室における過去の経験¹⁴⁾ から最も適したものとされているクロトン油の注射により行つた。クロトン油はハズの種子から採取した植物油であり、局所刺激性の極めて強いものであるが、油性であるため吸収はされにくいものと思はれる。第5表はクロトン油の成分を示したものである。これはそれ単独では刺激が強すぎるために私はオリーブ油によつて1/5～1/500に希釈して用いた。

第5表 クロトン油成分表 (9)

オ	レ	イ	ン	酸	37.0%	
リ	ノ	リ	ン	酸	19.1	
ア	ラ	キ	ヂ	ン	酸	1.52
ミ	リ	ス	チ	ン	酸	7.45
グ	リ	セ	リ	ン		7.20
非	鹼	化	成	分		0.25
ス	テ	ア	リ	ン	酸	1% 以下
パ	ル	ミ	チ	ン	酸	
ラ	ウ	リ	ン	酸		
パ	レ	リ	ア	ン	酸	
チ	グ	リ	ン	酸		
酪				酸		
蟻				酸		

実験動物は無麻酔のまま専用の固定台に固定し、大きく開口させその両側軟口蓋弓中央部附近に、額帯鏡照明下に丁度扁桃時の局麻剤注射と同じ要領で、粘膜下に上述の希釈クロトン油を左右それぞれ 0.2cc づつ注射した。この際うまく注入できれば粘膜下に直経 5mm 前後の水胞が形成されるのが明らかに観察される。

口蓋注射をうけた動物はやや興奮状態を示すが 1/100 以上希釈されているクロトン油の場合には死亡することはない。

注射後 1 時間経過した動物より第 1 部に述べた方法で外リンパ液を採取し、その遊離アミノ酸を測定した。

第3章 実験結果

その結果は正常時にみられるグルタミン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸の 7 種の他にシステイン酸、アルギニン、ヒスチジン、リジンの 4 種のアミノ酸が新たに出現しているのが注目される (第 6 表)。

私はこれらの新たなアミノ酸がクロトン油そのものの

第 6 表 口蓋刺激時モルモット外リンパ遊離アミノ酸

実験番号	外リンパ量 mg	グルタミン	アラニン	スレオニン	グリシン	セリン	グルタミン酸	アスパラギン酸	システイン酸	アヒリルスギチジニジン	備考
52	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1/200 クロトン油
56	42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	〃
57	43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	〃
68	49	+	+	+	+	+	+	—	+	+	1/500 クロトン油
71	35	+	+	+	+	+	—	—	+	+	〃
82	36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	〃
83	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	〃
84	37	+	+	+	+	+	±	+	+	+	1/200 クロトン油

第 7 表 腹部皮下クロトン油注射後モルモット外リンパ遊離アミノ酸

実験番号	外リンパ量 mg	グルタミン	アラニン	スレオニン	グリシン	セリン	グルタミン酸	アスパラギン酸	システイン酸	アヒリルスギチジニジン	備考
32	35	+	+	+	+	+	+	+	—	—	1/200 クロトン油
41	42	+	+	+	+	+	+	+	—	—	1/5 〃
42	35	+	+	+	+	+	+	+	±	—	〃
43	30	+	+	+	+	+	+	+	±	—	1/200 〃
44	33	+	+	+	+	+	+	+	—	—	1/500 〃

影響によつて出現したのかどうかを知るためにモルモット腹部皮下に希釈クロトン油を注射して比較して見たが、この場合はまったく正常時と同様の構成を示すことを知つた (第 7 表)。しかも腹部皮下の場合は口蓋注射に用いたよりも 100 倍も濃い 1/5 希釈のものにおいてもなお全く変化を示していない。

第 4 章 総括及び考按

口蓋刺激時¹⁴⁾や扁桃摘時⁶⁸⁾に全身に生ずる反応が Reilly 現象に基づくものであることは先きの述べ通りである。

すなわち口蓋に発した刺激が上頸部交感神経節¹⁶⁾⁶⁰⁾をつたつて一旦中枢に達し⁵¹⁾、下降して全身各臓器に血

管運動神経の異常に起因する変化を生ぜしめるものと思はれるが、そのような変化は当然内耳にも及ぶものと考えてよいであろう。すなわち内耳血管系の収縮や拡張、それにともなう透過性の昂進等一連の機能的変化が内耳液の組成の変動をきたし得ることはむしろ当然と云えよう。しかしながらこの点を考えるに当つては内耳血管系の機構やその特殊性、特にいはいゆる hemato-labyrinthine barrier の問題、内耳液生成の問題等に注目せねばならない。

即ち内、外リンパ液の生成機転については主として色素、薬物を用いて研究されてきたが、近年に至つては放射性同位元素を用いての研究が種々行はれるようになった。この場合外リンパ液のみについて考えて見ると Key u. Retzius²⁰⁾, Rüedi⁴²⁾, Harrison¹³⁾, 坪井⁵⁷⁾, 後藤¹¹⁾ 等による研究より見て、外リンパ液はその多くを外リンパ腔壁ラセン靱帯血管より、そしてその一部を蝸牛小管を通じて髄液より受けていると考えるのが最も妥当のように思はれる。

口蓋刺激によつてひきおこされる全身の血管性変化は、それが極度に強い場合には不可逆性となり、内分泌系を含めて更に第二、第三の変化を誘発し、最終的にはショック死に至るのであるが、私の実験では刺激の強度が比較的弱いために可逆性であり、血管の透過性が変化する程度に止まると思はれる。そして上述の外リンパ生成機転の一部に異常がひき起され、血清中のアミノ酸が遊出してきたものがこれら刺激時のみに見られる4種のアミノ酸の起源であろう。内耳の血管系には脳における blood-brain barrier と同じような hemato-labyrinthine barrier の存在することは Nomura³³⁾, Ottaviani³⁵⁾ その他によつてのべられている通りである。脳においても γ -アミノ酪酸は barrier を通過し得ないと云う事実もあり、システイン酸以下4種のアミノ酸が正常状態においては barrier を通過し得ず、透過性の昂進したと見られる状態においてはじめて出現すると考えるのは必ずしも不当ではない。もしこれが事実とすれば barrier における透過性はかなり複雑かつ微妙な機構によつて統御されているものと考えられる。このことについては教室の臼井⁵⁹⁾ が精細な研究を行つているが、それによれば血管の透過性を高めると考えられる薬剤を投与した場合には、上述の4種のアミノ酸が明らかに出現するのである。つまりこの異常アミノ酸の出現はクロトン油による特異的な変化ではなく、口蓋刺激によつて自律神経を介して生じた Reilly 現象の結果、内耳血管系の透

過性昂進を起こしたことの一つの証左であらうと思はれる。

内耳と自律神経の関係については、Portmann³⁸⁾, Berger⁶⁾, 秋山⁴⁾, 菊地²²⁾, 渡辺⁶²⁾, 小出²³⁾, 岩田¹⁸⁾, Perlman et al³⁷⁾, Chevance⁷⁾⁸⁾ 等が色々の角度から論じている。特に Chevance⁷⁾ はショック時のモルモット内耳の組織学的研究において、血管系に局限した毛細管の浸出を示唆する所見を見ている。

これらの報告によつても自律神経の刺激によつてまず最初に毛細管透過性が昂進し、その一つの現われとして分子量の比較的大きなアミノ酸が遊出して来ると云う仮説もうなづけるところである。

Perlman & Kimura³⁷⁾ によつて観察されたショック時の内耳血管の麻痺的拡張はこのような変化の最終段階であり、私の観察はその最初の段階であるとも云うことができる。

いずれにせよ出現した4種のアミノ酸そのものについては特に意義はなく、血中に普通に存在するもので、検体の量を何倍かにすれば外リンパ液中にも正常状態において存在し得る可能性は充分である。ただその分子量がやや大であるためかそれ以外の未知の理由によるのか barrier を自由に通過し得なかつただけの問題であらう。従つてアミノ酸以外の物質においても同様の態度をとるものがあることは考慮に入れねばならないところである(第8表)。

第8表 アミノ酸分子量表

アラニン	89.1
アルギニン	174.21
アスパラギン酸	133.11
システイン酸	169.15
グルタミン酸	147.13
グルタミン	146.15
グリシン	75.0
ヒスチジン	155.1
リジン	146.19
スレオニン	119.12
セリン	105.1

第5章 結 語

1/200 希釈及び 1/500 希釈のクロトン油をモルモットの口蓋に注射すると、1時間後にその外リンパ液に第1部でのべた7種類のアミノ酸の他に新たに4種のアミノ酸が出現することをのべた。更にこのような変化はクロ

トン油を腹部皮下に注射した場合には決して起らず、口蓋と云う場所的特異性によるものであり、これが Reilly 現象に基ずく内耳血管の透過性昂進によつて起るものと推論し、文献的考察をも行つた。

第3部 モルモット髄液の遊離アミノ酸について

第1章 緒 言

第1部において私はモルモット外リンパ液の遊離アミノ酸について述べ、更に外リンパ液の生成機転に関する考察を行つた。そしてその中で外リンパ液はその多くを血管よりの分泌に、一部を蝸牛小管を通じて髄液からの供給によつているのであるとのおべてきた。私はこの点を更に深く研究するため、モルモット髄液の遊離アミノ酸の分析を行い、外リンパ液と比較検討しようと試みた。

今日迄髄液中の遊離アミノ酸に関する報告は Wiechmann et al⁶¹⁾, Harris¹²⁾, Richiter et al⁴⁰⁾, Solomon⁴⁸⁾, Torre et al⁵⁴⁾, Alava¹⁾, Ludewig et al²⁹⁾, Walker et al⁶⁰⁾, Knauff et al²¹⁾, Schiavini⁴³⁾, Schönb-erg⁴⁴⁾, Shidara⁴⁶⁾, Kemali¹⁹⁾, Logothetis²⁷⁾ 28), 等による正常者、各種神経疾患患者に関する研究がみられるがモルモットに関するものは見られない。

又次に口蓋刺激後に外リンパ液の場合と同様髄液にも遊離アミノ酸構成の変動が起こるが否かを追求した。この問題の解明は外リンパの生成機転や組成の変動の起こる場所を知る上にきはめて重要である。しかしながらこれに関する先人の報告はこれ又まったくなされていない。

第2章 実験方法

実験動物として、体重 300g～400g、主として雄性のアルビノモルモットを使用した。その他の条件は第1部に述べたと同様である。

髄液の採取は次のようにして行つた。まず動物を麻酔し、後頭部に皮切を施し、筋層を剥離し後頭骨と第一頸椎との間で硬膜を露出する。ここに先端の直経約 0.2 mm のガラス管を刺入すると液は髄液圧によつて自然に上昇する。

麻酔による影響をしらべるためエーテル麻酔と 25% ウレタン腹腔内注射麻酔の2法を併用した。

採取した検体は計量の後、第1部にのべたと同様二次元ペーパークロマトグラフ法により、その遊離アミノ酸を測定した。

検体の量は外リンパの場合と比較するためほぼ同量、

すなわち約 30～50mg とした。しかし髄液の濃度は外リンパ液よりもややうすいように思はれ、そのため若干多めにした方がよい結果が得られた。一匹のモルモットからは僅に 200～300mg の髄液を採取し得るので外リンパ液の場合と異り一匹分の一部によつて一回の実験を行ひ得た。

除蛋白その他の処理は行なはなかつた。その他測定条件は外リンパ液の場合と同一条件である。

次に口蓋刺激の方法としては第二部に述べたと同様 1/200 及び 1/500 に希釈したクロトン油を用い、これを動物の両側軟口蓋に各 0.1cc 宛注射し、1時間後に髄液を採取した。これを同じく二次元ペーパークロマトグラフ法によりその遊離アミノ酸を測定した。

第3章 実験結果

このようにして得られた結果は、まず正常時について見ると第9表に示すとおりである。すなわちグルタミン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、ヒスチジン、リジン、バリン、ロイシンの12種類の遊離アミノ酸を検出することができる。

第9表 正常モルモット髄液遊離アミノ酸

実験番号	髄液量 mg	グ	ア	ス	グ	セ	グ	ア	ア	ヒ	バ	ロ	シ
		ル	ラ	レ	リ	タ	パ	ス	ギ	チ	リ	イ	テ
		タ	ニ	ー	ン	ミ	ギ	ン	ニ	ン	ン	ン	ン
		ン	ン	ン	ン	ン	ン	酸	酸	ン	ン	ン	酸
81	41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86	66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
87	79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
88	61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93	61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94	63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

次に口蓋刺激後の髄液に見られるアミノ酸は第10表に示すとおりであつて、正常の場合とまったく異なるところがなかつた。

第10表 口蓋刺激時モルモット髄液遊離アミノ酸

実験番号	髄液量 mg	グルタミン	アラニン	スレオニン	グリシン	セリン	グルタミン酸	アスパラギン酸	アヒルスギチニン	バリシン	ロイシン	システイン	備考
89	37	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	—	1/200 グロトン油 1 時間後
90	33	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	—	ク
91	32	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	ク
92	42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	ク
101	68	+	+	+	+	+	—	+	+	±	+	—	ク 2 時間後
102	61	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	—	ク 3 時間後

第4章 総括及び考按

以上の結果を外リンパ液の場合と比較すると、その主たる構成成分は同一であるが、更に5種類も多くのものが検出されており、両者の間に明らかな相違のあることが分かる。

第二部において私は諸家の説を総合しつつ外リンパ液の起源について述べたが、この事実も又リンパ液と髄液の関連性についての基礎的知見に役立つものであろう。

元来髄液は内耳液と異り生体から容易に、しかも大量に採取し得るので、その生化学的研究も19世紀末(Key u. Retzius²⁰⁾ 1875) すでに芽生えており、特に神経系疾患との関連において多くの研究がなされている。

そして髄液と内耳液との相関的研究は色素等の異物によるもの以外では蛋白(Smith et al⁴⁷⁾、伊藤¹⁷⁾等)、電解質(三宅⁸²⁾等)、などによるものが見られるが、アミノ酸による比較は行はれていない。

そして髄液と外リンパ液との遊離アミノ酸構成の相異はこの両者の構成自体の相異につながるものであり、この事実は諸家の研究結果ともよく一致するものである。

定量的分析は行っていないのでアミノ酸の濃度に言及することはできないが、一般的に云つて髄液の方がやや濃度が低いように思われる。このことは30mg以下の試料では髄液の場合にはアミノ酸が極めて検出し難くなることによつて裏書きされる。蛋白量に関する実験でもLedoux²⁶⁾、Smith et al⁴⁷⁾、Antonini et al³⁾、伊藤¹⁷⁾

等いづれも髄液の濃度は外リンパ液の数分の1にすぎないとしているのである。

さて次に口蓋刺激後の髄液アミノ酸についてのべて見ると、既述のように髄液においては外リンパの場合と異り、口蓋刺激によつてその遊離アミノ酸構成に変動をきたすことはない。従つて外リンパに起つた変化は髄液が蝸牛小管を経由して外リンパに流れ込んだために起つたのではなく、外リンパそれ自体における変化であると言うことが確認された訳である。その経路は第2部で精説した如く血管系—ラセン靱帯—以外には存在しない。それ故神経血管系の反応すなわち Reilly 現象によつて外リンパの変化が生じたのではないかと云う考えは、本実験によつて更に強い裏付けを得たと云えよう。

第5章 結 語

モルモット髄液の遊離アミノ酸を二次元ペーパークロマトグラフ法によつて測定し、グルタミン、アラニン、スレオニン、グリシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、ヒスチジン、リジン、バリン、ロイシンの12種類を検出した。そして外リンパ液と髄液との相異点をアミノ酸構成の面から明らかにした。次にこの構成が外リンパ液の場合と異り口蓋刺激によつて変動をきたさないことを述べ、このことから口蓋刺激による外リンパ液の変化は髄液に起源を有さず、外リンパ腔周囲の血管系よりの分泌に由来するものと推論した。

第4部 モルモット外リンパ液、髄液、血清中の C.R.P. について

第1章 緒 言

C.R.P. (C-reactive protein) は 1930 年 Tillet, Francis⁵²⁾ によつてはじめて報告されたものである。彼等は肺炎球菌菌体成分の多糖類 C 分画が、肺炎患者の血清と沈降反応を起こすことに注目した。この反応はやがて肺炎患者のみならず各種の細菌性疾患患者の血清においても起ることが見出され、その特異な反応様式から、これは抗原抗体反応とは別個のものであらうと考えられるようになった。

そしてこの物質は硫酸アンモン法ではアルブミン分画に、電気泳動法では α, β グロブリンに属する蛋白性物質であることが確かめられた。更に McCarty³⁰⁾ は人及びサル以外の動物血清中に出現する C_x-多糖類を分離した。これは本質的には C 多糖類と同一の物質であるが、C 多糖類の沈降反応より鋭敏である。

さて、この C.R.P. が陽性化する疾患として、各種の炎症性疾患、悪性腫瘍、リウマチ熱等が知られているが、耳鼻科領域においても急性扁桃炎等の他、扁桃摘出術施行後⁵⁾ にも出現を見ることが多い。

このように C.R.P. は急性期に際し、原因と関係なく非特異的に出現するいはゆる急性期反応物質の一種であり、その起源、生成機序などについては、細網内皮系産生説等もあるが、なお充分に解明されていない。

一方 Chevance⁸⁾、伊藤¹⁷⁾ はモルモットの口蓋に刺激を加えた際の内耳液、髄液、血清の C.R.P. の動きを追究し、C.R.P. 出現は対する自律神経の役割を重視している。

私はこれまで口蓋刺激が内耳液に及ぼす影響を、遊離アミノ酸を指標として研究してきたが、次にこの C.R.P. を指標として研究し、若干の知見を得ることができた。

第2章 実験方法

実験動物として、遊離アミノ酸の研究に用いたのと同様体重 300～400g の健康な雄性アルビノモルモットを使用した。

動物の麻酔はエーテル麻酔、ウレタン麻酔の2法を用いた。

麻酔後、まず後頭骨と第一頸椎の間より後頭下穿刺により髄液を採取、次いで断頭し頸動脈より採血、最後に中耳胞を開放し正円窓より外リンパ液を採取した。

採取した検体は 56°C 30 分間加熱非動化し、Hyland 社製 CR-test によつてその C.R.P. を測定した。

一般に C.R.P. の測定には毛細管内で被検血清と抗血清を接触させてその反応を見る capillary precipitation method が用いられているが、私の場合のように極微量、低濃度でしかも対照が C_x. R.P. である時は Hyland 社の凝集反応方式の方が適当と思はれるのでこれを採用した。

外リンパ液、髄液の場合はその蛋白濃度が血清のそれに比較して極めて低いことが知られているので、私はこの両者については凍結乾燥法により 5～10 倍に濃縮したものを検討した。この場合乾燥後の溶解には緩衝液を用いた。

次に口蓋刺激は 1/100 希釈クロトン油を 0.1cc づゝ動物の両側軟口蓋に注射することによつて行つた。

口蓋刺激から 1 時間のち、先にのべた方法で血清、髄液、外リンパ液を採取し、その C.R.P. を測定した。

第3章 実験結果

まず正常例においては血清、髄液、外リンパ液共 C.R.P. の出現を見ない（第 11 表）。髄液、外リンパ液の場合は凍結乾燥法による濃縮を試みたことは前章にのべたが、その結果も第 12 表にみられるように陰性であ

第 11 表 正常モルモット外リンパ、髄液、血清 C.R.P.

No.	外リンパ	髄液	血清	備 考
3	—	—	—	ウレタン麻酔
4	—	—	—	〃
5	—	—	—	〃
7	—	—	±	エーテル麻酔
8	—	±	—	〃
9	—	—	—	〃
10	—	—	—	〃

第 12 表 濃縮時正常モルモット外リンパ、髄液 C.R.P.

No.	外リンパ	量 mg	髄液	量 mg	備 考
12	—	15	—	193	外リンパ液は 3 四分
13	—	10	—	219	〃
14	—	17	—	176	〃
15	—	14	—	252	〃
16	—	11	—	238	〃
17	—	18	—	206	〃

る。試料の絶対量の問題もあると思われるので外リンパ液は3四分をまとめたものについて調べたが、総量 20 mg 以下の範囲では結果に変わりはない。

次に口蓋刺激後1時間のものを見てみるとその結果は第13表のとおりである。即ち血清において60%の陽性化率をみているのである。髄液、外リンパでは陽性化率は大幅に低下するが、濃縮したもの(第14表)について見ると率はやや高くなる。

対照として腹部皮下に同量のクロトン油を注射したものについて見ると第15表の如く正常の場合と全く差が見られない。

第13表 口蓋刺激時モルモット外リンパ、髄液、血清 CRP

No.	外リンパ	髄液	血 清	備 考
20	—	+	++	1/100 クロトン油
21	—	—	+	〃
22	—	+	+	〃
23	—	+	+	〃
26	—	—	±	〃
27	—	—	±	〃
28	—	—	—	〃
29	—	—	—	〃

第14表 口蓋刺激後濃縮時モルモット外リンパ、髄液 C.R.P.

No.	外リンパ	量 mg	髄液	量 mg	備 考
40	—	10	—	152	外リンパ3四分
43	—	15	+	220	〃
44	+	14	+	198	〃
45	—	18	—	259	〃
47	—	8	—	213	外リンパ2四分
48	+	9	+	207	〃
49	±	12	—	181	〃

第15表 腹部皮下クロトン油注射後外リンパ髄液、血清 C.R.P.

No.	外リンパ	髄液	血 清	備 考
33	—	—	—	1/100クロトン油1時間後
34	—	—	—	〃
35	—	—	—	〃
36	—	—	—	〃
37	—	—	—	〃

第4章 総括及び考按

以上私はモルモット外リンパ液、髄液、血清中の C.R.P. について研究し、クロトン油口蓋刺激後1時間で、特に血清中 C.R.P. が陽性化することを知った。この中で特に重要な意義を有するのは1時間と云う短時間に C.R.P. が陽性化すると云う事実である。これは Che-vance⁸⁾、伊藤¹⁷⁾ もすでに認めていることがあるが、この時間的な早さと、クロトン油を腹部皮下に注射しただけでは陽性にならないと云うことなどから、口蓋部位の刺激と云う局所的要因と C.R.P. の出現とは密接な関係が考えられる。しかしながらこれは今まで私がのべてきたアミノ酸の変動とは全く異なる面を有している。即ちアミノ酸の場合は血中に正常に存在するアミノ酸が内耳血管透過性の変化によつて外リンパ液中に出現すると考えられるが、C.R.P. の場合は明らかに正常には存在しない蛋白性物質が口蓋刺激によつて新たに出現してくるのである。

さてこの C.R.P. の出現機序については不明の点が多い。クロトン油は炎症性物質であるが口蓋注射の場合と腹部皮下注射の顕著な差は、口蓋と云う部位の場所的特異性を重視しない訳にはいかない。C.R.P. の生成部位が細網内皮系とすれば自律神経との密接な関係は首肯される所である。従来の報告によれば炎症発現後 C.R.P. の出現迄の時間は少くとも6時間以上を要する⁵⁰⁾。これは私の成績とはかなり相違しているが、あるいは口蓋刺激→自律神経刺激が C.R.P. の形成を促進するのも知れない。扁桃施行後の患者の C.R.P. が特別早期に出現すると云う報告はないが、短時間内の変動は追求していない場合が多いので比較はなし得ない。いずれにせよ動物実験の結果によつてこのような問題まで早急に論ずることは種々不足があり、出現機序の点については今後の研究にまたねばならない。

外リンパ液、髄液における C.R.P. の出現率は血清におけるよりもはるかに低率であつたが、これは一部にはその蛋白濃度の差にもよると思はれる。濃縮も試みたが量的な限界もあり血清蛋白濃度と同程度迄濃縮することはできなかった。いずれにせよかかる異常蛋白が早期に外リンパ液にまで現れると云うことは大きな問題であり、これが内耳機能になんらかの影響を与え得る可能性も当然考えられる所である。

第5章 結 語

モルモットの口蓋刺激により、その血清、髄液、外リンパ液中に正常には決して存在しない一種の異常蛋白物

質 C.R.P. が高率に出現するが、その様式の特異性から自律神経性要素が大きいと想像されることについてのべた。更に C.R.P. の出現機序、意義等について考察したがこれらの点にはなお不明の点が多い。

参考文献

- 1) *Alava, A.G.*: Clin. y. Labor. 64: 253, 1957.
- 2) *Aldred, P., et al*: J. physiol. 98: 446, 1940.
- 3) *Antonioni, E. et al*: Annals of ORL. 56: 129, 1957. 4) 秋山登: 日耳鼻, 59: 1237, 1955. 5) 阿部矯一, 他: 日耳鼻, 66: 1404, 1963. 6) *Berger, M.*: Rev. de Laryng.-Otol.-Rhinologie 83: 925, 1962. 7) *Chevance, L.G.*: Acta Otolaryng. 49: 509, 1958. 8) *Chevance, L.G.*: Acta Otolaryng. 50: 37, 1959. 9) *Flaschentrager*: Helv. chem. Acta 17: 1444, 1934. 10) 深沢久夫: 耳鼻咽喉科, 30: 169, 1958. 11) 後藤修二, 他: 日耳鼻, 61: 394, 1957. 12) *Harris, M.*: J. clin. invest. 22: 569, 1943. 13) *Harrison, M.S. et al*: J. Laryng. Otol. 72: 117, 1958. 14) 飯田稔: 耳鼻咽喉科, 30: 169, 1958. 15) 五十嵐篤男: 日耳鼻, 63: 941, 1960. 16) 井上寿樹: 日耳鼻, 63: 995, 1960. 17) 伊藤明和: 日耳鼻, 64: 923, 1961. 18) 岩田逸夫: 耳喉, 30: 240, 1958. 19) *Kemali, D.*: Acta neurol. 12: 419, 1957. 20) *Key, A., Retzius, G.*: Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes. Stockholm 1875. 21) *Knauff, H. G. et al*: Klin. Wschr. 36: 739, 1958. 22) 菊地三通男: 耳鼻臨, 50: 508, 1957. 23) 小出靖: 耳鼻臨, 50: 377, 1957. 24) 倉井秀夫: 日耳鼻, 63: 1701, 1701, 1960. 25) *Laborit, H.*: Réaction organique á l'agression et choc 1955. 26) *Ledoux, A.*: Acta med. Belg. 1950. 27) *Logothetis, J.*: Neurol. 5, 767, 1955. 28) *Logothetis, J.*: World Neurol. 2: 747, 1961. 29) *Ludewig, S.*: Arch. Neurol. Psychiat. 70: 268, 1953. 30) *McCarty, J. Exp. Med.* 93: 25, 1951. 31) 松生榮治: 日耳鼻, 60: 502, 1957. 32) 三宅弘: 日耳鼻 61回総会シンポジウム. 33) *Nomura, Y.*: Annals of ORL. 70: 81, 1961. 34) 永瀬邦彦: 日耳鼻, 61: 1480, 1958. 35) *Ottaviani, A. et al*: Acta Otolaryng. 56: 715, 1963. 36) 大野文朗: 日耳鼻, 63: 56, 1960. 37) *Perlman, H.B. et al*: Annals of ORL. 64: 1176, 1955. 38) *Portmann, G.*: Rev. de Laryng.-Otol.-Rhinologie 52: 467, 1931. 39) *Reilly, J. et al*: Soc. de Biol. 1934. 40) *Richter, D. et al*: J. ment. sci. 95: 148, 1949. 41) *Ricker, G.*: Entwurf einer Rerationspathologie G. Fischer Verlag 1905. 42) *Rüedi, R.*: Annals of ORL. 60: 993, 1951. 43) *Schiavini, A.C. et al*: Minerva pediat. 9: 1486, 1957. 44) *Schönberg, H.*: Z. Kinderh. 75: 301, 1954. 45) *Selye.*: 適応症候群 (田多井訳), 1952. 46) *Shidara, R.*: J. indust. inst. ment. Health 2, 2, 1959. 47) *Smith, C.A. et al*: Laryngoscop. 64: 141, 1954. 48) *Solomon, J.D.*: J. biol. chem. 171. 675, 1947. 49) *Speransky, A.D.*: A basis for theory of medicine 1943. 50) 塩川優一, 他: 臨床病理, 5: 4, 1957. 51) 杉山繁: 日耳鼻, 67: 631, 1964. 52) *Tillet, W.S. et al*: J. exp. med. 52: 561, 1930. 53) *Tonndorf, G. et al*: Annals of ORL. 71: 801, 1962. 54) *Torre, M.*: Boll. soc. ital. Biol. sper. 29: 196, 1953. 55) 高垣玄吉郎: 慶応医学, 5: 7, 1964. 56) 玉川健二郎: 日耳鼻, 63: 978, 1960. 57) 坪井邦夫: 日耳鼻, 63: 697, 1960. 58) 塚田裕三, 他: 生化学, 33: 51, 1961. 59) 白井大一郎: 日耳鼻, 67: 1215, 1964. 60) *Walker, B.S. et al*: Arch. Neurol. Psychiat. 73: 148, 1955. 61) *Wiechmann, E. et al*: Dtsch. Arch. Klin. Med. 1. 153: 1926. 62) 渡辺嘉彦: 日耳鼻, 64: 1325, 1961. 63) 山崎嘉司: 日耳鼻, 66: 940, 1963. 64) 吉川久夫: 日耳鼻, 58: 696, 1955.

稿を終るに臨み、終始御指導、御校閲を賜った恩師鈴木安恒教授に深甚なる謝意を表すると共に、御教示をいただいた本学薬理学校室細谷英吉教授、斎藤章二助教授並びに教室員各位に感謝する。

本論文の要旨は日本耳鼻咽喉科学会第64回総会、日本耳鼻咽喉科学会関東地方会第401回例会、第45回総会において発表した。

(原稿到着=昭和39.6.18日—急載)