

四塩化炭素肝障害ラットにおける ¹⁵N-ロイシン代謝に及ぼすバリンの影響

沖 田 美佐子

1. 緒 言

肝不全をはじめ術後や感染症などにおける蛋白栄養不良状態の改善を目的として分枝鎖アミノ酸の補給が試みられ、その効果が広く認められている⁽¹⁻⁴⁾。肝硬変例では病態の進展とともに血漿分枝鎖アミノ酸濃度が低下し、芳香族アミノ酸ならびにメチオニン濃度の異常な上昇を認める⁽⁵⁾が、著者ら⁽⁶⁾は分枝鎖アミノ酸の補給がこのような血漿アミノ酸インバランスを是正し、肝における蛋白合成を促進することを認め報告してきた。さらに、分枝鎖アミノ酸は主として筋でアミノ基転移を受ける数少ないアミノ酸であるため、高インスリン血症の存在により糖利用の低下した肝硬変例では、筋におけるエネルギー源として分枝鎖アミノ酸の酸化が亢進し、これに共役してアンモニア処理がなされることも示唆されている⁽⁷⁾。しかし、ケトン原性のロイシンと糖原性のバリンでは代謝経路も異なり、その作用に相違があると推測され、ロイシンによる蛋白合成促進⁽⁸⁾やバリンによる血中アンモニアの低下⁽⁹⁾などの報告があり、どちらがより有効であるか明らかでない。分枝鎖アミノ酸の補給を目的として各種栄養剤の研究開発が進められている中で、ロイシンとバリンの作用機序の相違と、病態に適した望ましいロイシンとバリンの補給比率はなお検討されねばならない課題である。

本報では、肝障害ラットにおける蛋白合成ならびに窒素代謝に及ぼす分枝鎖アミノ酸補給比の影響を¹⁵N-ロイシンを用いて検討した。

2. 実験方法

(1) 実験動物

S D系雌ラット(平均体重 160 g, 日本クレア)を用い、実験前 7 日間は標準飼料(日本クレア, C E - 2)で飼育した。次いで、14 時間の絶食後に 0.7 ml / 100 g 体重の 20% 四塩化炭素 / 流動パラフィン液を胃内に投与して急性肝障害ラットを作製した。以後ラットは絶食、自由給水とした。

(2) アミノ酸投与

ラットを 3 群におけ、表 1 に示す組成のアミノ酸溶液をそれぞれ(4 ml / 100 g 体重)胃内に投与した。アミノ酸溶液の分枝鎖アミノ酸組成は 1973 年の FAO / WHO アミノ酸評点パターンに従い、重量比で¹⁵N-ロイシン:バリン:イソロイシンを 7 : 5 : 4 としたものを標準群とした。低バリン群はバリンを標準群の 1/4 に減少し、高バリン群では 4 倍に増加して、アラニンで総窒素量をそろえた。¹⁵N-ロイシン(95 atom %)は昭光通商(東京)、その他のアミノ酸は和光純薬の製品を使用した。アミノ酸投与後は代謝ケージ内で自由給水し、塩酸酸性としたガラス容器内に蓄尿した。

表 1. 投与アミノ酸溶液の組成

	標準群	低Val群 (mg/ml)	高Val群
¹⁵ N-Leucine	11.0	11.0	11.0
Valine	8.0	2.0	32.0
Isoleucine	6.0	6.0	6.0
Alanine	18.0	23.0	0
合計	43.0	42.0	49.0

(3) 採血および組織の採取

アミノ酸投与 5 時間後にエーテル麻酔下で頸静脈より採血し、直ちに断頭して脳を採取し氷冷した。肝は氷冷生理食塩水で灌流した後に、骨格筋は右大腿筋を採取した。

(4) 分析方法

a 試料の調整

脳(小脳を除く全脳)、肝および大腿筋組織は 3 倍量の生理食塩水でホモジナイズしたのち 15% TCA で蛋白を沈澱せしめ、0.45 μm のフィルターを通して非蛋白分画を分離した。蛋白分画は 15% TCA で更に 2 回洗浄後、水でホモジナイズして分析に供した。

各組織の蛋白ならびに非蛋白分画をmicro-Kjeldahl法で分解、蒸留して全窒素をアンモニアとして稀硝酸液に補集した。この補集液に30% NaOHを加えてゴム栓(0.1 N HCl 0.1 mlを含み上部に窓を有する小ガラス管を取り付けた)をつけ、40℃で72時間加温、生じたアンモニアを0.1 N HClに吸着せしめて窒素を濃縮した。これを凍結乾燥して塩化アンモニウムの結晶を得た。

血漿および尿のウレア-¹⁵N測定はゼオライトでアンモニアを除いたのち、Conwayの微量拡散法を用いて、urease (EC 3.5.1.5, Sigma)作用により生じたアンモニアを0.1 N HClに吸着させた。

b ¹⁵Nの測定法

¹⁵Nの測定は発光分光分析法⁽¹⁰⁾により行った。すな

わち、塩化アンモニウムとして得られた試料を窒素含量1 mg/mlとなるように水に溶解し、外径2 mm、長さ1 cmのガラス管に吸収させ乾燥した。これを外径4 mm、長さ20 cmのガラス管に入れ窒素ガス化試薬(CuOとあらかじめ900℃で3時間以上加熱し放冷したCaOをよく混合し、加圧整型したもの)と共に、放電管作製装置(大内理化工業)にて10⁻³ Torr以下に減圧し、Xe-He(2:98)の混合ガスを約10 Torr導入し封管した。次いでこれを560℃で2時間加熱し窒素ガス化させた。以上のようにして作製した放電管を冷却後N-150型¹⁵N分析装置(日本分光工業)にて測定した。図1に測定例を示した。

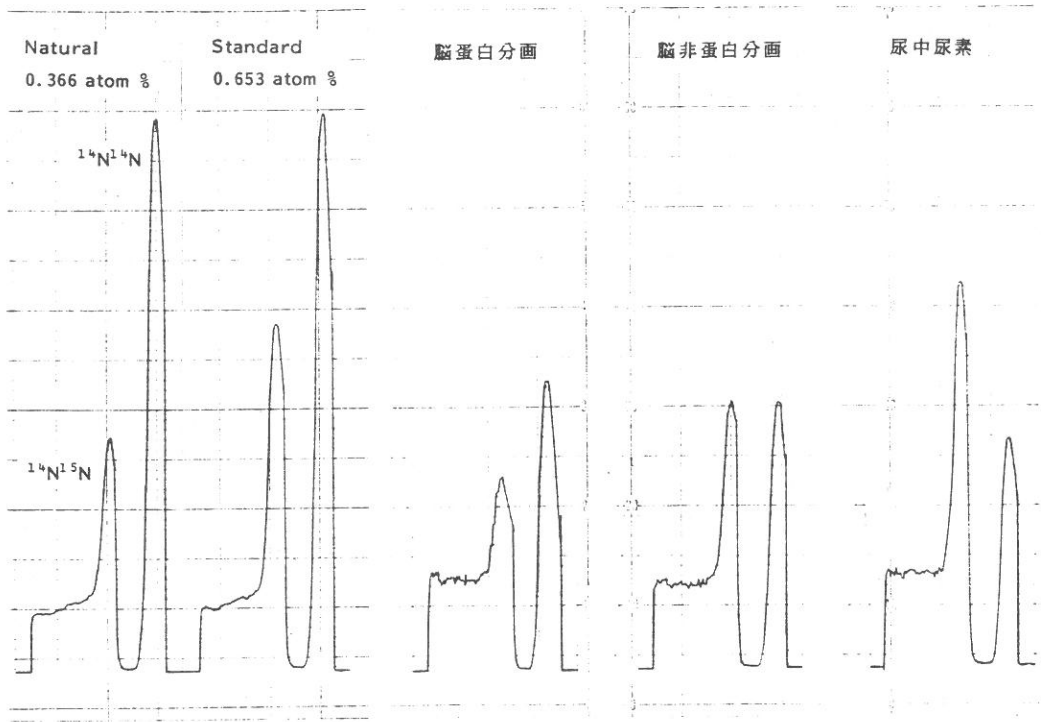


図 1. ¹⁵N 分析例

3. 実験結果

(1) 肝、脳および骨格筋内 ¹⁵N 存在率

蛋白分画内 ¹⁵N 存在率は図2に示すように肝で最も高く、脳や骨格筋では肝の1/2以下であった。肝の蛋白分画内 ¹⁵N 存在率は高バリン群が低バリン群に比し有意の低値を示し、バリン比率の高い分枝鎖アミノ酸補給では蛋白合成も低下することが推測された。

非蛋白分画中の ¹⁵N 存在率(図3)は脳が肝や骨格筋よりも高く、しかも低バリン群が標準群や高バリン群に比し有意に高い ¹⁵N 存在率を示し、バリン比率の小さい方が脳内へのロイシンのとりこみが増加することが示された。

(2) ¹⁵N ウレア生成と排泄

¹⁵N-ロイシン(1.1 mg/100 g 体重)を単独投与し

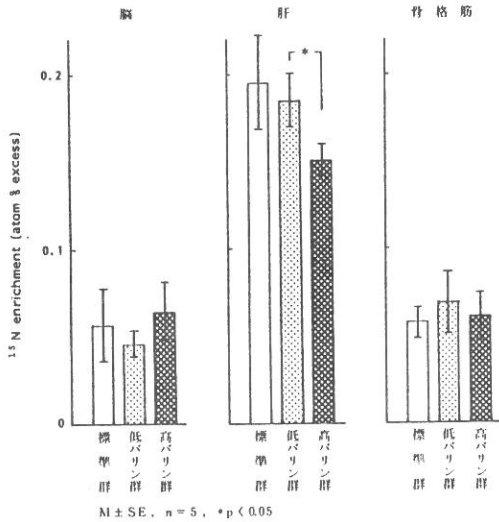


図2. ¹⁵N-ロイシン投与5時間後の脳、肝および骨格筋蛋白内¹⁵N存在率に及ぼすバリン比率の影響

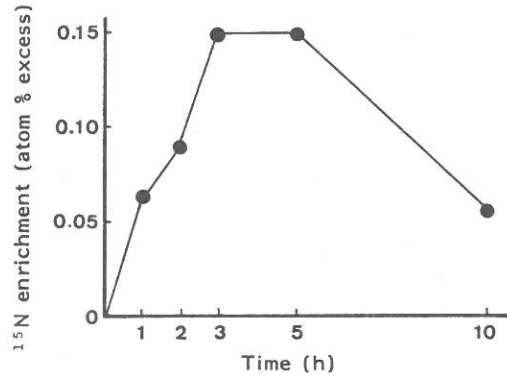


図4. ¹⁵N-ロイシン投与後の血漿ウレア-¹⁵Nの推移

表2. ¹⁵N-ロイシン投与5時間後の血漿Urea-NおよびUrea-¹⁵N濃度

Rat	Urea-N	Urea- ¹⁵ N	
	(mg/dl)	(atom % excess)	(mg/dl)
標準群	23.5 ± 1.2	1.97 ± 0.19	0.46 ± 0.06
低Val群	20.4 ± 1.3	1.95 ± 0.12	0.40 ± 0.02
高Val群	23.8 ± 1.0*	1.80 ± 0.24	0.45 ± 0.04

M ± SE, n = 5, *p < 0.05

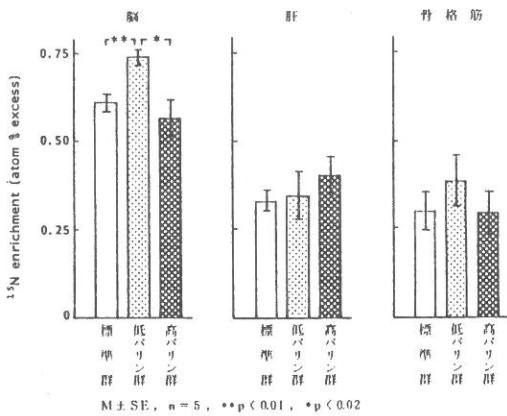


図3. ¹⁵N-ロイシン投与5時間後の脳、肝および骨格筋内非蛋白¹⁵N存在率に及ぼすバリン比率の影響

て血漿ウレア-¹⁵Nの推移を観察した結果(図4)から¹⁵N-ロイシン投与3時間後には血漿ウレア-¹⁵N濃度はほぼ最高値(0.148 atom % excess)に達し、5時間後にもなお高値を持続し、10時間後には0.056 atom % excessまで減少した。

アミノ酸投与5時間後の血漿ウレア-N濃度は低バリン群が高バリン群に比し有意の低値を示し、ウレア-¹⁵N濃度も低い傾向にあった(表2)。しかし、アミノ酸投与後5時間の尿中ウレア-N排泄量に相違は認められず、ウレア内¹⁵N存在率は高バリン群が高値の傾向を示したもののウレア-¹⁵N排泄率には3群間に有意差を認めるには至らなかった(図5)。

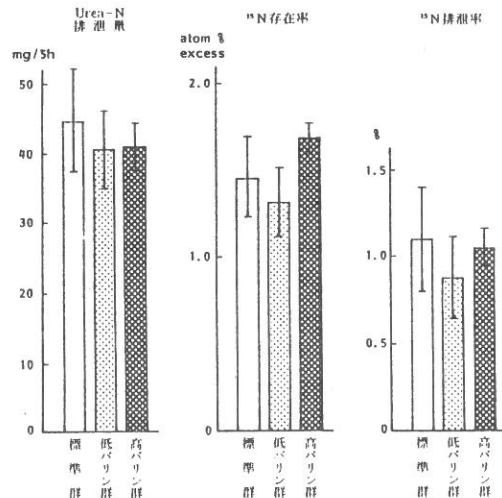


図5. ¹⁵N-ロイシン投与5時間の尿中Urea-¹⁵N排泄に及ぼすバリン比率の影響

4. 考 察

^{15}N -ロイシン投与5時間後の肝蛋白内には明らかな ^{15}N のとり込みが認められた。肝はプレアルブミン、トランスフェリンやレチノール結合蛋白などの rapid turnover protein をはじめアルブミンなど蛋白合成の盛んな臓器であり、しかも肝障害時にも蛋白合成に対してかなりの予備力があるとされる⁽¹¹⁾ので、分枝鎖アミノ酸投与の影響がすみやかに現われたものと推測される。しかし、バリン比率が高い場合には ^{15}N のとり込みは明らかに抑制された。

脳非蛋白分画内 ^{15}N 存在率は他の組織すなわち肝や骨格筋に比べ約2倍の高値を示した。これは、脳内にとり込まれた ^{15}N -ロイシンは ^{15}N -グルタミン酸や ^{15}N -グルタミンの生成を介してアンモニアを処理し⁽¹²⁾、脳内に滞留するためと推論される。さらに、脳の非蛋白分画内 ^{15}N 存在率が低バリン群で高値であったことは、 ^{15}N -ロイシンの脳内とり込みがバリンと競合することを示唆するものである。

骨格筋においても低バリン群で ^{15}N のとり込みの促進傾向が認められたが、脳と同様にバリンとの競合がないためであろうか。肝ではこれに反し、高バリン群で非蛋白内 ^{15}N 存在率が高い傾向にあった。この結果は、高バリン群において ^{15}N -ロイシンの蛋白内とり込みが低下するとともに、 ^{15}N -ロイシン代謝の遅延が生じていることを示唆するものと考えられる。

ロイシン投与後の組織内とりこみと酸化の亢進ならびに蛋白合成の促進はロイシンによるインスリン分泌を介してなされるとの報告がある⁽¹³⁾。しかしながら、

四塩化炭素肝障害時の血中IRI濃度は著しく上昇しており、分枝鎖アミノ酸投与後もその濃度に明らかな変化を認めなかった⁽¹⁴⁾点でインスリンの作用によるものとは判定しがたい。

今回、 ^{15}N -ロイシンを用いて得られた結果からは、肝障害時の分枝鎖アミノ酸補給にはロイシンを中心にバリン配合比を小さくした組成のものが蛋白合成の上からも効果的であると考えられた。これは ^{15}N -塩化アンモニウムを用いたこれまでの報告⁽¹⁴⁾を支持するものである。

5. 要 約

- (1) 分枝鎖アミノ酸補給比のあり方を、四塩化炭素急性肝障害ラットに、 ^{15}N -ロイシンをバリン配合比をかえてイソロイシンとともに胃内投与して検討した。
- (2) ^{15}N の分析は発光分光分析法によった。
- (3) 肝蛋白分画内 ^{15}N 存在率は低バリン群で高値であった。
- (4) 脳内非蛋白分画内 ^{15}N 存在率は低バリン群で高値を示した。
- (5) 尿中 ^{15}N 排泄率には有意差を認めなかった。
- (6) 肝障害時にはロイシン配合比が大きくバリン比率の小さい分枝鎖アミノ酸補給が効果的であると推論された。

本研究は文部省科学研究費補助(研究課題番号62571016)によるものである。

文

献

- 1) McGhee, A., Henderson, J.M., Millikan, W.J., Bleier, J.C., Vogel, R., Kassouny, M., and Rudman, D.: Comparison of the effects of Hepatic-Aid and a casein modular diet on encephalopathy, plasma amino acids, and nitrogen balance in cirrhotic patients. *Ann. Surg.*, **197**: 288-293, 1983.
- 2) Marchesini, G., Zoli, M., Dondi, C., Bianchi, G., Girulli, M., and Pisi, E.: Anticatabolic effect of branched-chain amino acid enriched solutions in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, **2**: 420-425, 1982.
- 3) Cerra, F. B., Upson, D., Angelico, R., Wiles, C. III, Lions, J., Faulkenbach, L., and Paysinger, J.: Branched chains support postoperative protein synthesis. *Surgery*, **92**: 192-199, 1982.
- 4) Nachbauer, C.A., James, J.H., Edwards, L.L., Ghory, M.J., and Fischer, J.E.: Infusion of branched chain-enriched amino acid solutions in sepsis. *Am. J. Surg.*, **147**: 743-752, 1984.
- 5) Morgan, M.Y., Marshall, A.W., Milsom, J.P., and Sherlock, S.: Plasma amino acid patterns in liver disease. *Gut*, **23**: 362-370, 1982.
- 6) Okita, M., Watanabe, A., and Nagashima, I.: A branched-chain amino acid-supplemented diet in the treatment of liver cirrhosis. *Curr. Ther. Res.*, **35**: 83-92, 1984.
- 7) Odessey, R., Khairallah, E.A., and Goldberg, A.L.: Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **249**: 7623-7629, 1974.

四塩化炭素肝障害ラットにおける¹⁵N-ロイシン代謝に及ぼすバリンの影響

- 8) Bonau, R.A., Ang, S.D., Jeevanandam, M., and Daly, J.M. : High-branched chain amino acid solutions : Relationship of composition to efficacy. *JPEN*, **8** : 622-627, 1984.
- 9) Riederer, P., Kleinberger, G., and Weiser, M. : Oral and parenteral nutrition with L-valine : Mode of action. *Nutr. Metab.*, **24** : 209-217, 1980.
- 10) Kumazawa, K. : Advance in analytical method of heavy nitrogen in Japan. *JARQ*, **20** : 92-99, 1986.
- 11) 水谷正之 : ¹⁵Nを利用した部分的肝切除および四塩化炭素肝障害ラットのアルブミン合成能の検討 : 日消誌, 83 : 991-998, 1986.
- 12) 渡辺明治 : 脳内アンモニア代謝の異常と肝性昏睡—アミノ酸代謝との関連を中心に。 *Medical Postgraduates*, **22** : 540-547, 1984.
- 13) Soeters, P.B., and Fischer, J.E. : Insulin, glucagon, aminoacid imbalance, and hepatic encephalopathy. *Lancet*, **23** : 880-882, 1976.
- 14) Okita, M., Watanabe, A., and Tsuji, T. : Effect of branched-chain amino acid on ¹⁵N incorporation into liver and skeletal muscle proteins following [¹⁵N]-ammonium chloride administration to carbontetrachloride intoxicated rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34** : 85-96, 1988.

昭和64年1月7日受付

平成元年3月16日受理