

肝障害時における¹⁵Nを用いたロイシンとバリン代謝の比較的検討

沖田 美佐子

1. 緒言

肝不全における分枝鎖アミノ酸療法は、脳症の予防と治療に有効であるとともに、蛋白栄養不良の改善をもたらすことが認められている。

肝障害時の分枝鎖アミノ酸補給にあたり、より効果的な各分枝鎖アミノ酸の補給比率について検討を進める中で、これまでに、ロイシンに比しバリンは代謝が遅く、特に肝障害時には著しいバリン代謝の遅延が認められることを報告した⁽¹⁾。この点をさらに追求するために、本報では¹⁵Nで標識したL-ロイシン(¹⁵N-L-Leu)とL-バリン(¹⁵N-L-Val)を用いて、四塩化炭素(CCl₄)急性肝障害ラットにおける¹⁵Nの利用と代謝を比較検討した。

2. 実験方法

(1) 実験動物

SD系雄性ラット(平均体重175g、日本クレア)を、実験前の7日間は標準飼料(日本クレア、CE-2)で飼育して使用した。14時間(一夜)の絶食後に20%CCl₄/流動パラフィン液、0.7ml/100g体重を胃内投与して、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

CCl₄投与24時間後に、急性肝障害ラットを2群(各群5匹)に分け、250μmol/100g体重の¹⁵N-L-Leuまたは¹⁵N-L-Val(いずれも95atom%, 昭光通商、東京)を胃内に単回投与した。アミノ酸投与後は、ラットを個別に代謝ケージに入れ、自由給水とし、塩酸性としたガラス容器内に蓄尿した。

(3) 採血および組織の採取

¹⁵N-L-Leuまたは¹⁵N-L-Val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水冷した。肝は水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

血清アルブミンはIwataら⁽²⁾の方法に従い、トリ

クロロ酢酸-エタノール法で分離した。脳、肝および大腿筋は前報⁽³⁾と同様に15%トリクロロ酢酸で蛋白分画と非蛋白分画に分けた。¹⁵N測定試料の調整ならびに¹⁵Nの測定方法は前報⁽³⁾と同様である。

血漿アミノ酸分析は、高速液体クロマトグラフィー、アミノ酸分析システム(島津LC-6A, 蛍光検出器RF-535, 京都)を用いてOPA法により行った。血漿は同量の7%トリクロロ酢酸で除蛋白した後、その2μlを注入した。

3. 実験結果

(1) 血漿アミノ酸濃度

対照ラット(流動パラフィンのみ投与の24時間後)および急性肝障害ラットにおける¹⁵N-L-Leuまたは¹⁵N-L-Val投与前(CCl₄投与の24時間後)と投与5時間後について、血漿中性アミノ酸濃度を比較したのが図1である。急性肝障害ラットにおける血漿バリン、ロイシン、フェニールアラニン、チロシン、

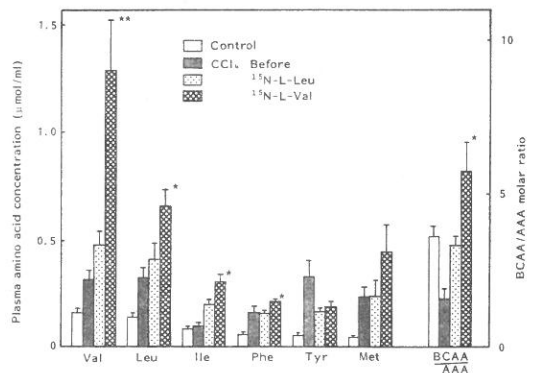


図1. 肝障害ラットの¹⁵N-L-Leuまたは¹⁵N-L-Val投与前および投与5時間後と対照ラットの血漿アミノ酸濃度の比較

M±SE, ¹⁵N-L-Leu群と¹⁵N-L-Val群の比較; **p<0.01, *p<0.05

メチオニン濃度は対照ラットより有意に上昇しており、高アミノ酸血症の状態にあった。また、分枝鎖アミノ酸 (BCAA) / 芳香族アミノ酸 (AAA) モル比が 1.5 まで低下していた。

^{15}N -L-Leu の投与後においては、バリンとイソロイシン濃度が有意の増加を示したもののロイシン濃度の増加は認められなかった。また、チロシン濃度に有意の低下を認めた。 ^{15}N -L-Val 投与後は、バリンの著明な増加とともにロイシン、イソロイシン濃度も有意の増加を示した。 ^{15}N -L-Leu 投与群と比較すると ^{15}N -L-Val 投与群が、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびフェニルアラニン濃度の有意の高値を示し、メチオニン濃度も高い傾向にあった。BCAA / AAA モル比は、 ^{15}N -L-Leu 投与群が対照ラット (3.5 ± 0.4) とほぼ同値 (3.3 ± 0.3) まで上昇したのに対し、 ^{15}N -L-Val 投与群では 5.7 ± 1.0 の高値を示した。

(2) 蛋白分画内 ^{15}N 存在率

図 2 に血清アルブミンおよび肝、大腿筋、脳の蛋白分画内 ^{15}N 存在率を示した。

血清アルブミン内 ^{15}N 存在率は、 ^{15}N -L-Leu 投与群 (0.207 ± 0.021 atom%) が ^{15}N -L-Val 群 (0.111 ± 0.027) に比し有意の高値を示した。アルブミン濃度には両群間に全く差を認めなかった (^{15}N -L-Leu 群: 3.4 ± 0.4 g/100 ml, ^{15}N -L-Val 群: 3.4 ± 0.18 g/100 ml)。肝蛋白分画においても ^{15}N -L-Leu 群が ^{15}N -L-Val 群に比し有意に高い ^{15}N 存在率を示した。大腿筋と脳では、 ^{15}N -L-Leu 群が高い傾向を示したものの有意差を認めるには至らなかった。

(3) 非蛋白分画内 ^{15}N 存在率

肝、大腿筋および脳の非蛋白分画内 ^{15}N 存在率を図 3 に示した。

脳では、 ^{15}N -L-Leu 群が ^{15}N -L-Val 群に比し

有意の高値を示したのに対し、肝では ^{15}N -L-Leu 群が低い傾向にあった。大腿筋では両群間に差をみなかった。

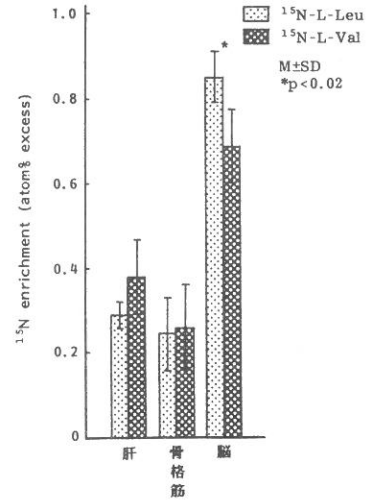


図 3. ^{15}N -L-Leu または ^{15}N -L-Val 投与 5 時間後の肝、骨格筋および脳の非蛋白分画内 ^{15}N 存在率

(4) 尿素 - ^{15}N の合成と排泄

表 1 は、血漿中の非蛋白 - ^{15}N 濃度ならびに尿素 - ^{15}N 濃度を示したものである。

表 1. ^{15}N -L-Leu または ^{15}N -L-Val 投与 5 時間後の血漿中非蛋白窒素および尿素窒素内 ^{15}N 存在率の比較

	^{15}N -L-Leu 群	^{15}N -L-Val 群
非蛋白窒素濃度 (mg/100 ml)	50.5 ± 8.1	58.2 ± 7.6
^{15}N 存在率 (atom% excess)	0.623 ± 0.110	0.743 ± 0.105
非蛋白 - ^{15}N 濃度 (mg/100 ml)	0.33 ± 0.11	0.45 ± 0.12
尿素窒素濃度 (mg/100 ml)	13.4 ± 3.0	13.2 ± 1.5
^{15}N 存在率 (atom% excess)	1.684 ± 0.110	1.476 ± 0.133
尿素 - ^{15}N 濃度 (mg/100 ml)	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.04

M ± SE. *p < 0.02

血漿中の遊離アミノ酸や尿素を含めた総非蛋白窒素内 ^{15}N 存在率は ^{15}N -L-Val 群が ^{15}N -L-Leu 群に比し高い傾向にあった。しかし、尿素窒素のみについて ^{15}N 存在率を比較すると ^{15}N -L-Leu 群が高い傾向を示したものの、いずれも有意差を認めるほどではなかった。

尿中への ^{15}N の排泄は、表 2 に示すように、 ^{15}N -L-Leu 群が ^{15}N -L-Val 群に比し、尿素窒素内 ^{15}N 存在率が有意の高値を示すとともに、尿素 - ^{15}N 排泄量および総窒素内 ^{15}N 排泄量いずれも ^{15}N -L-Leu 群が高い傾向にあった。

表 2. ¹⁵N-L-Leu または ¹⁵N-L-Val 投与後 5 時間の尿中窒素排泄量の比較

	¹⁵ N-L-Leu 群	¹⁵ N-L-Val 群
総窒素		
総窒素量 (mg/5 h)	56.9 ± 5.5	56.7 ± 5.1
¹⁵ N 存在率 (atom % excess)	1.417 ± 0.168	1.167 ± 0.124
¹⁵ N 量 (mg/5 h)	0.81 ± 0.14	0.67 ± 0.12
尿素窒素		
尿素窒素量 (mg/5 h)	32.2 ± 4.5	29.4 ± 6.2
¹⁵ N 存在率 (atom % excess)	2.308 ± 0.224*	1.534 ± 0.253
尿素- ¹⁵ N 量 (mg/5 h)	0.76 ± 0.16	0.50 ± 0.15

M ± SE. *p < 0.05

4. 考 察

肝はアミノ酸代謝の主たる臓器であり、肝硬変などの重症肝疾患では処理能の低下を反映して、血漿メチオニン、チロシン、フェニールアラニンあるいはトリプトファン濃度などが増加する。これに対し、血漿分枝鎖アミノ酸濃度は、肝硬変病態の進行とともに低下が顕現してくる。

肝硬変における血漿分枝鎖アミノ酸濃度の低下の原因は未だ十分解明されていない。高インスリン血症に基づく末梢のインスリン感受性の低下によって、グルコースの利用が低下し、その結果、分枝鎖アミノ酸が筋における代替エネルギー源となること⁽⁴⁾、肝におけるアンモニア処理の減少を反映して、骨格筋においてグルタミン生成を介してアンモニア処理がなされ、この時、分枝鎖アミノ酸がグルタミン酸の供給源として消費されること⁽⁵⁾などが推論されている。

肝硬変例に対する分枝鎖アミノ酸補給は、血漿アミノ酸インバランスの是正と蛋白合成の促進あるいはアンモニア代謝の促進などの点で種々の効果が認められている。経口投与された分枝鎖アミノ酸は、大部分が肝細胞にとりこまれることなく大循環に放出され、骨格筋⁽⁵⁾あるいは脂肪組織⁽⁶⁾にとりこまれる。分枝鎖アミノ酸のアミノ基転移酵素活性は、骨格筋を含めて広く分布しており、体構成組織に占める骨格筋の比率からみても、分枝鎖アミノ酸の大部分が骨格筋において代謝の第一段階を受けると考えられている。一方、分枝鎖ケト酸脱水素酵素活性は肝に著しく高い⁽⁷⁾。しかし、骨格筋にも肝の 1/8 程度が存在するため、通常の分枝鎖アミノ酸代謝は骨格筋において十分行い得る。しかしながら、過剰の分枝鎖アミノ酸補給時には肝の分枝鎖ケト酸脱水素酵素が重要な役割を有するようになる。肝障害ラットに対して過剰量のロイシンまたはバリンを投与した本研究の成績においても、血漿ロイ

シン濃度はロイシン投与の 5 時間後には投与前値まで低下したにもかかわらず、バリン投与後の血漿バリン濃度は、5 時間後にもなお著明な高値を持続するとともにロイシンやイソロイシンも明らかに上昇し、分枝鎖アミノ酸すべての代謝遅延を引き起こしていることが認められた。さらに、BCAA/AAA モル比も対照ラットの値を越えて著しい高値を示し、投与前とは逆の血漿アミノ酸インバランスの状態にあった。肝硬変例におけるバリン不耐の報告⁽⁸⁾もあり、肝障害時の分枝鎖アミノ酸補給においては、バリンの補給量が過剰とならないよう考慮すべきである。

血清アルブミンおよび肝蛋白分画への¹⁵Nのとりこみがロイシン投与群がバリン投与群に比べ有意の高値であるとの結果を得た。分枝鎖アミノ酸がストレス時の肝アルブミン合成を促進させることが報告されており⁽⁹⁾、特にロイシンが蛋白合成の促進と分解の抑制作用を有するとの多くの報告があり⁽¹⁰⁾、今回の結果もそれを裏づけるものである。

投与した¹⁵N-L-Leu と¹⁵N-L-Val の体内利用効率の比較のために、尿中¹⁵N排泄を観察した。しかし、投与後 5 時間という短時間であったために、代謝の速い¹⁵N-L-Leu 投与群が排泄量が多い傾向にあり、さらに長時間にわたる検討が必要と考えられる。

5. 要 約

(1) CCl₄ 急性肝障害ラットに 250 μmol/100 g 体重の¹⁵N-L-Leu または¹⁵N-L-Val を胃内投与して窒素代謝を比較検討した。

(2) ¹⁵N-L-Leu 投与 5 時間後の血漿ロイシン濃度は投与前値まで低下したが、¹⁵N-L-Val 投与では、血漿バリン濃度の著明な増加のみならずロイシンやイソロイシン濃度にも増加が認められた。

(3) 血清アルブミンおよび肝蛋白分画内¹⁵N存在率は、¹⁵N-L-Leu 投与群が有意の高値であった。

(4) 脳非蛋白分画内¹⁵N存在率は、¹⁵N-L-Leu 投与群が有意の高値を示した。

(5) 尿中¹⁵N排泄量は、¹⁵N-L-Leu と¹⁵N-L-Val の両群間に有意差を認めなかった。

(6) ロイシンはバリンに比し、肝障害時にも蛋白合成に利用されやすく、また、速かに代謝・排泄される窒素源であることが認められた。

本研究は文部省科学研究費補助（研究課題番号 01571240）によるものである。

文 献

- 1) Okita, M., Watanabe, A., and Tsuji, T. : Effects of valine on ^{15}N incorporation into serum and tissue protein and non-protein fractions following ^{15}N -L-leucine administration to normal and liver-injured rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35 : 1989. in press.
- 2) Iwata, T., Iwata, H., and Holland, J. F. : Isolation of albumin from human serum by means of trichloroacetic acid and ethanol. *Clin. Chem.*, 14 : 22-30, 1968.
- 3) 沖田美佐子 : 四塩化炭素肝障害ラットにおける ^{15}N -ロイシン代謝に及ぼすバリンの影響. 岡山県立短大研究紀要, 33 : 19-23, 1989.
- 4) Marchesini, G., Forlani, G., Zoli, M., Dondi, C., Bianchi, G., Bua, V., Vannini, P., and Pisi, E. : Effect of euglycemic insulin infusion on plasma levels of branched-chain amino acids in cirrhosis. *Hepatology*, 3 : 184-187, 1983.
- 5) Goldberg, A. L., and Chang, T. W. : Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. *Fed. Proc.*, 37 : 2301-2307, 1978.
- 6) Goodman, H. M. : Site of action of insulin in promoting leucine utilization in adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 233 : 97, 1977.
- 7) Shinnick, F. L., and Harper, A. E. : Branched-chain amino acid oxidation by isolated rat tissue preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, 437 : 477-486, 1976.
- 8) Ferenci, P., Bratusch-Marrain, P., Waldhäusl, W. K., Nowotny, P., and Korn, A. : Impaired plasma amino acid clearance in patients with cirrhosis of the liver and portocaval shunt - its relation to insulin resistance. *Europ. J. Clin. Invest.* 14 : 255-261, 1984.
- 9) Schwartz, S., Farriol, M., Montoya, A., Gómez Lechón, M. J., and Castell, J. V. : Branched-chain amino-acids and albumin synthesis. Study with hepatocytes of normal and stressed rats. *Clin. Nutr.*, 6 : 241-245, 1987.
- 10) Buse, M., Reid, S., A possible regulator of protein turn over in muscle. *J. Clin. Invest.*, 56 : 1250-1261, 1975.

平成元年12月20日受付

平成2年1月11日受理