

肝障害ラットにおける¹⁵N-L-ロイシンと¹⁵N-L-バリン投与後の血漿、骨格筋および脳遊離アミノ酸濃度と¹⁵N量

沖田 美佐子

緒 言

実験的ならびに臨床における多くの研究^{1,2)}から、分枝鎖アミノ酸(BCAA)が蛋白代謝の制御因子であることが示唆されている。さらに、BCAAは肝不全時の蛋白・エネルギー栄養不良を改善するとともに、骨格筋や脳におけるアンモニア処理能を高め、肝性脳症の予防と治療に有効であると認められている。しかし、最近、BCAAの有効性に関して疑問を投げかけるもの³⁾もあり、今後なお検討されるべき問題が残されている。著者は、これまで肝障害時のBCAA補給とくにロイシン(Leu)とバリン(Val)の補給効果の比較検討を行ってきた⁴⁾。

本報では、四塩化炭素(CCl₄)急性肝障害ラットおよび対照ラットに対して¹⁵N-L-Leuと¹⁵N-L-Valを胃内に投与し、血漿遊離アミノ酸濃度の推移ならびに骨格筋と脳の遊離アミノ酸濃度と¹⁵N量、さらに尿中¹⁵N排泄量について検討し、LeuとValの補給効果を比較した。

実験方法

(1) 実験動物

体重170-180gのSD系雄ラット(日本クレア)を使用した。ラットは標準飼料(日本クレア, CE-2, 100g中に蛋白質23.6g, 脂質4.4g, 炭水化物52.7gを含有)で1週間飼育したものを14時間(一夜)絶食とした。この絶食ラットを2群に分け、一群に20% CCl₄/流動パラフィン液の0.7ml/100g体重を胃内投与して急性肝障害ラット(CCl₄ラット)を作製した。残りの一群には流動パラフィン0.7ml/100gのみを投与した(対照ラット)。以後、ラットは絶食、自由給水とした。

(2) アミノ酸投与

¹⁵N-L-Leuおよび¹⁵N-L-Val(いずれも95 atom%, 昭光通商, 東京)は250 μmol/3 mlの濃度で純水に溶

かした。

CCl₄および流動パラフィン投与の24時間後に、それぞれのラットを2群に分け、一方の群に¹⁵N-L-Leuを、他の群に¹⁵N-L-Valをそれぞれ250 μmol/100g体重、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、塩酸酸性にした容器内に蓄尿した。

(3) 採血および臓器の採取

¹⁵N-L-Leuまたは¹⁵N-L-Val投与後0.5, 1, 2, 3, 5および24時間後にエーテル麻酔下で頸静脈より採血した。脳、肝および骨格筋はアミノ酸投与後5時間と24時間で採取した。脳は断頭後直ちに取出し、氷冷生理食塩水で洗浄後、-20°Cで保存した。肝は氷冷生理食塩水で灌流したのちに採取、骨格筋は右大腿筋を採取し、同様に保存した。

(4) 分析方法

血漿は7%トリクロル酢酸(TCA)で除蛋白し、骨格筋と脳は3倍量の生理食塩水でホモジナイズしたものを15%TCAで除蛋白して、その上清を0.45nmのフィルターで濾過したのちに遊離アミノ酸の分析に供した。アミノ酸の分析および¹⁵Nの分析方法は前報⁴⁾と同じである。インスリンはラジオイムノアッセイ(2抗体法)⁵⁾により測定した。

実験結果

(1) 血漿遊離アミノ酸濃度の推移

¹⁵N-L-Leuまたは¹⁵N-L-Val投与後の血漿BCAA濃度の推移を図1に示した。対照ラットにおける¹⁵N-L-Leu投与後の血漿Leu濃度は30分後に1.6 μmol/mlまで上昇したのち、1時間後にはその37.9%に、さらに2時間後には投与前値まで低下した。CCl₄ラットでは、対照ラットに比し30分後では低値を、逆に60分後には高値を示し、吸収の遅延が推測された。CCl₄

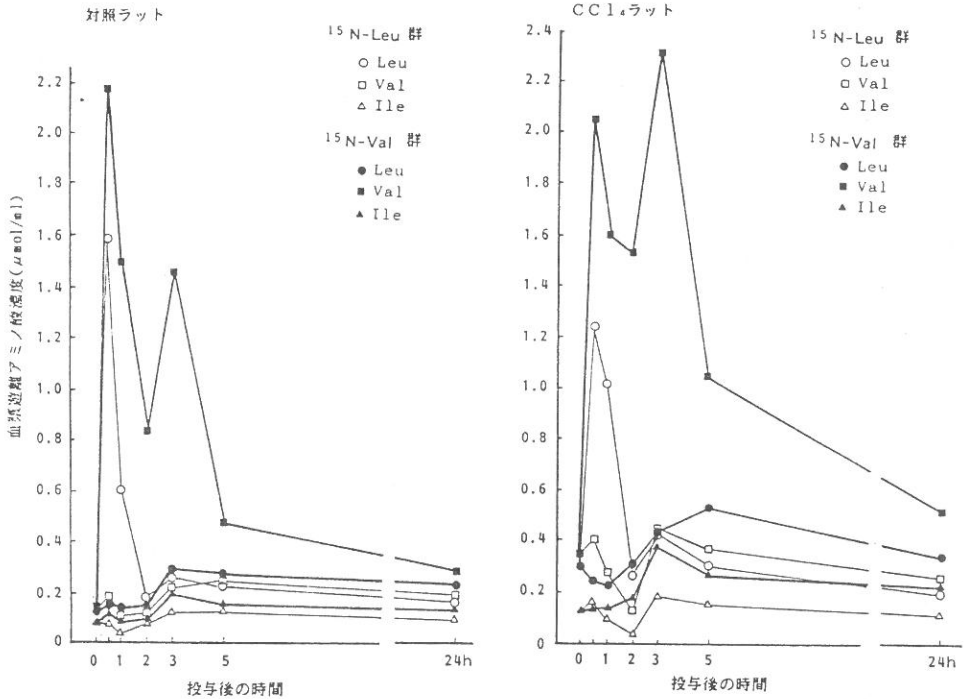


図1 対照ラットおよびCCl₄急性肝障害ラットに対する¹⁵N-L-Leuと¹⁵N-L-Val投与後の血漿アミノ酸濃度の推移

ラットの¹⁵N-L-Leu投与2時間後ではLeuとともにValやIleも投与前値の89.2% (Leu), 38.5% (Val), 38.6% (Ile)までそれぞれ低下し、3時間後には再び投与前値をこえて増加した。対照ラットでは¹⁵N-L-Leu投与2時間後の血漿Leu, ValとIleの低下はみられなかったが、3時間後には増加した。¹⁵N-Val群の血漿Val濃度は対照ラット, CCl₄ラットともに30分後に著しく上昇し、両群間に相違をみなかった。対照ラットでは¹⁵N-L-Val投与の1および2時間後の血漿Val濃度は著しく低下(30分値に比し1時間後に66.0%, 2時間後に36.7%)した。これに対し, CCl₄ラットでは低下率が明らかに小さかった(30分値に比し1時間後に78.3%, 2時間後に75.0%)。さらに、一時的に低下した血漿Val濃度は3時間後に再び上昇し、とくにCCl₄ラットで3時間後の上昇が30分値をこえる著しい高値であった。その後Val濃度は減少するが, CCl₄ラットでは5時間後にも投与前値の319%を維持し、24時間後にも162%の高値で、Leuに比し代謝の遅延が明らかであった。対照ラットでは、CCl₄ラットに比べ、血漿Val濃度は速やかに減少したが、Leu濃度の減少に比べやはり減少率に遅れがみられた。

血漿インスリン (IRI) 値の変化を図2に示した。IRI値は対照ラットでは5時間および24時間後にも低値で、¹⁵N-L-Leuと¹⁵N-L-Val投与の影響はみられな

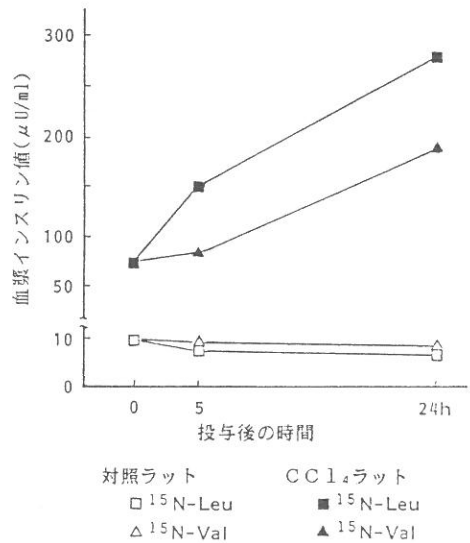


図2 対照ラット及びCCl₄急性肝障害ラットに対する¹⁵N-L-Leuと¹⁵N-L-Val投与後の血漿インスリン値の推移

かった。CCl₄ラットのIRI値は投与前にも著しく高いが、¹⁵N-L-Leu投与後には¹⁵N-L-Val投与群に比し、5時間後、24時間後ともに高値であった。

(2) 骨格筋および脳内遊離アミノ酸濃度

¹⁵N-L-Leuおよび¹⁵N-L-Val投与後5時間と24時間の骨格筋内遊離アミノ酸濃度を表1に示した。対照ラットでは¹⁵N-L-Leu群と¹⁵N-L-Val群ともに投与5時間ではLeu, ValとIle濃度に増加がみられ、とくに¹⁵N-L-Val群のVal濃度が著しい高値を示した。24時間後にはLeuやValを含め、全てのアミノ酸が投与前値と同濃度であった。CCl₄ラットでは投与前の骨格筋内ア

ミノ酸濃度は対照ラットに比しすべて高値で、とくにBCAAが高濃度を示した。

CCl₄ラットの¹⁵N-Leu群では、投与5時間後にLeu, Ileとメチオニン (Met) が投与前値より低下し、Valも低下傾向を示した。24時間後でもBCAA濃度に変化がなかったが、チロシン (Tyr) のみは上昇した。CCl₄ラットの¹⁵N-L-Val群では、5時間でIleの低下を認めたのみでLeuの変化はなく、Valはむしろ増加した。

脳内遊離アミノ酸濃度の変化は表2に示すとおりである。対照ラットの¹⁵N-Leu群ではLeuのみ上昇し、¹⁵N-L-Val群ではValの著しい増加とLeuの軽度の増加

表1 骨格筋内遊離アミノ酸濃度

アミノ酸	時間 (h)	対 照 ラ ッ ト		CCl ₄ ラ ッ ト			
		投 与 前	¹⁵ N-Leu	¹⁵ N-Val	投 与 前	¹⁵ N-Leu	¹⁵ N-Val
			nmol/g				
Leu	0	296±38			642±88##		
	5		457±91	384±39		416±2	551±112
	24		303±53	331±48		400±15	400±58
Val	0	347±40			515±73#		
	5		470±75	715±36*		410±44	632±30*
	24		364±42	390±61		445±27	481±53
Ile	0	182±19			337±10###		
	5		289±56	275±25		233±15	292±34
	24		207±28	214±11		244±2	252±42
Phe	0	161±15			226±10##		
	5		210±55	206±22		230±6	309±100
	24		162±37	181±41		251±21	259±46
Tyr	0	158±29			272±10##		
	5		207±30	219±34		261±3	333±91
	24		195±16	224±22		405±79	361±41
Met	0	117±20			230±11###		
	5		125±10	109±10		160±2	209±40
	24		90±7	111±25		151±42	152±7
BCAA /AAA	0	2.6±0.2			3.0±0.2		
	5		2.9±0.3	3.3±0.2		2.2±0.2	2.4±0.5
	24		2.5±0.3	2.3±0.4		1.7±0.2	1.8±0.0

M±SD, n=3
###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05: 対照ラットと比較。 *p<0.05: ¹⁵N-Leu群と比較。

表2 脳内遊離アミノ酸濃度

アミノ酸	時間 (h)	対 照 ラ ッ ト		CCl ₄ ラ ッ ト			
		投 与 前	¹⁵ N-Leu	¹⁵ N-Val	投 与 前	¹⁵ N-Leu	¹⁵ N-Val
			nmol/g				
Leu	0	119±30			164±29		
	5		185±38	169±25		229±18	145±13**
	24		150±36	167±40		173±27	158±4
Val	0	121±21			163±11#		
	5		137±43	264±77		118±30	223±27*
	24		114±24	168±50		164±18	167±19
Ile	0	71±17			80±15		
	5		96±16	91±18		111±21	82±16
	24		74±15	83±20		86±12	77±7
Phe	0	80±9			89±9		
	5		114±34	92±4		135±11	89±9**
	24		84±31	138±15		138±20	117±10
Tyr	0	73±24			109±12		
	5		100±27	89±6		183±36	104±31*
	24		80±33	150±11*		188±32	167±24
Met	0	38±11			88±29#		
	5		42±26	45±25		81±26	79±13
	24		42±17	49±10		65±32	45±28
BCAA /AAA	0	2.0±0.2			2.0±0.0		
	5		2.0±0.5	2.9±0.5		1.4±0.5	2.4±0.4
	24		2.4±1.2	1.5±0.5		1.3±0.2	1.4±0.0

M±SD, n=3
#p<0.05: 対照ラットと比較。 **p<0.01, *p<0.05: ¹⁵N-Leu群と比較。

を認めた。CCl₄ラットの5時間後には¹⁵N-Leu群でLeu濃度の高値とVal濃度の低値が、¹⁵N-Val群でVal濃度の高値とLeu濃度の低値傾向を認め、脳内への移送に競合があるためと推測された。CCl₄ラットでは両群ともに24時間後にTyrとフェニールアラニン(Phe)濃度が高値を示した。

(3) 骨格筋および脳内¹⁵N量

¹⁵N-L-Leuまたは¹⁵N-L-Val投与5時間後の骨格筋内¹⁵N量は図3に示すように、CCl₄ラットでは¹⁵N-Leu群が¹⁵N-Val群に比し有意の高値を示し、対照ラットでも¹⁵N-Leu群において有意差を認めないものの高い傾向にあった。

脳内¹⁵N量(図4)は5時間後では対照ラットと

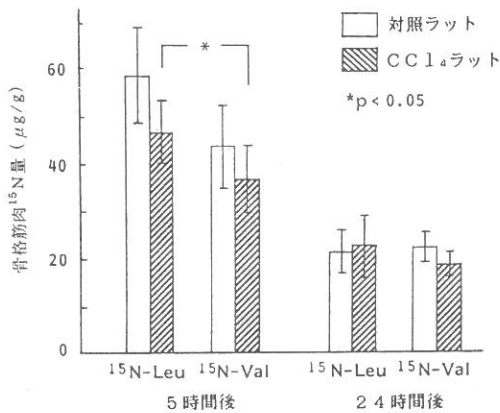


図3 対照ラットおよびCCl₄急性肝障害ラットに対する¹⁵N-L-Leuと¹⁵N-L-Val投与後の骨格筋内¹⁵N量

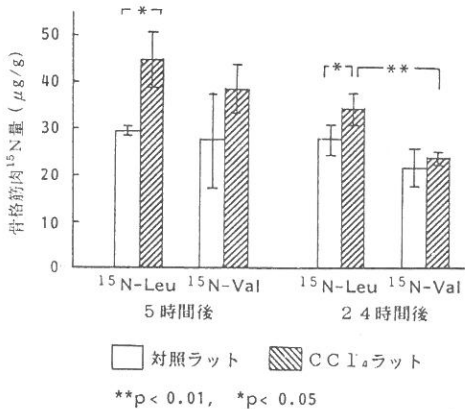


図4 対照ラットおよびCCl₄急性肝障害ラットに対する¹⁵N-L-Leuと¹⁵N-L-Val投与後の脳内¹⁵N量

CCl₄ラットいずれにおいても¹⁵N-L-Leuおよび¹⁵N-L-Val投与群間に明らかな差は認められなかった。しかし、24時間後にはCCl₄ラットで¹⁵N-Leu群が¹⁵N-Val群に比して有意の高値で、対照ラットでも¹⁵N-Leu群が、有意差を認めないまでも、高い傾向にあった。¹⁵N-Leu投与後の脳内¹⁵N量をCCl₄ラットと対照ラットで比較すると、CCl₄ラットが有意の高値を示した。

(4) 尿中¹⁵N排泄量

¹⁵N-L-Leuおよび¹⁵N-L-Val投与5時間と24時間における尿中¹⁵N排泄量を表3に示した。

CCl₄ラットの5時間尿中の¹⁵N排泄量は対照ラットに比し著しく高く、とくに¹⁵N-Leu群が¹⁵N-Val群よりも有意の高値を示した。24時間尿中の¹⁵N排泄量にはCCl₄ラットと対照ラットの間有意の差を認めなかったが、CCl₄ラットの¹⁵N-Val群で高値の傾向がみられた。

表3 尿中¹⁵N排泄量

時間 (h)	対照ラット		CCl ₄ ラット	
	¹⁵ N-Leu	¹⁵ N-Val	¹⁵ N-Leu	¹⁵ N-Val
	(%)			
5	4.5±1.3	3.9±0.4	15.1±2.5	11.5±2.1
24	16.1±1.2	12.7±3.2	20.2±0.8	22.7±2.8
M±SD, n=5				

考 察

血漿アミノ酸濃度は食事摂取後の腸管吸収と組織からの流入、および肝や骨格筋における臓器内代謝、あるいは腎からの排泄などによって変動し、ホルモン環境によって大きく影響を受ける。¹⁵N-L-Leuと¹⁵N-L-Valを胃内に大量単回投与して観察された血漿アミノ酸濃度の推移から、とくに肝障害時にはLeuとValには代謝速度のみならず、吸収に差異があることが推測された。これまで、最適栄養条件下あるいは栄養欠乏下におけるBCAAの腸管吸収がヒトを対象として研究されている⁴⁾。腸管におけるアミノ酸の吸収は能動輸送によるが、機能的に異なる2つの機構が関わっている。すなわち、遊離アミノ酸担体システムと、オリゴペプチド担体システムの2つである。前者には強い選択性があり、アミノ酸によって吸収されやすさが異なる。とくに疎水性アミノ酸であるValやLeuはよく吸収される。ヒト空腸の灌流実験⁷⁾で、BCAAの吸収を比較した結果によると、低濃度における吸収速度にValとLeuで相違を認めないが、ValのK_tが40mM、

Vmaxは90mmol/hであるのに対して、LeuではKtが21mM、Vmaxが46mmol/hと明らかに低値である。今回のBCAA投与では250 μ mol/3mlを単回に胃内に投与したため、ValがLeuより速く吸収され、その結果、血漿Val濃度の急速な上昇をもたらしたものと推測できる。CCl₄ラットにおける血漿Leu濃度の上昇の遅延は吸収速度の低下と受けとめられるが、なお詳細な検討が必要である。

¹⁵N-L-Val投与の3時間後にみられた血漿Val濃度の再上昇は、Valの代謝遅延に基づくと考えられる。ヒトにおける安定同位元素を用いた研究⁸⁾から、ValとLeuのアミノ基転移反応を比較すると、LeuがValの5倍とされる(K val/K leu: 0.180 \pm 0.012)。その他にも、骨格筋のアミノ基転移反応の速度はVal/Leuが0.35とする報告⁹⁾がある。BCAA代謝の第一段階に作用するBCAAトランスアミナーゼ活性は骨格筋に高く、したがって体組成に占める骨格筋の量からみても、BCAAの主な代謝部位は骨格筋である。しかし、分枝鎖ケト酸脱水素酵素活性は肝に著しく高い。また、BCAA代謝の制御部位は分枝鎖ケト酸脱水素反応にあるため、体内BCAA濃度が増加した場合には、肝における分枝鎖ケト酸の酸化速度がBCAA代謝に重要な意味を有するようになる。CCl₄肝障害ラットにみられた¹⁵N-L-Val投与3時間後の著しい血漿Val濃度の上昇は、肝における分枝鎖ケト酸脱水素反応の低下を反映したものと推論できる。

横隔膜を用いた *in vitro* の実験で、0.1mM Leuの添加が蛋白合成を促進させ、0.2-0.5mMになると蛋白合成を促進する以上に蛋白分解を減少させ、蛋白分解の抑制に α -ケトイソカプロン酸が関与していることが示唆されている¹⁰⁾。¹⁵N-L-Leu投与5時間後の骨格筋遊離アミノ酸濃度の低値は、骨格筋蛋白の分解抑制の結果とも考えられる。F-Steedら¹¹⁾によると絶食時に血漿BCAA濃度が上昇するが、このことがインスリンによる蛋白分解抑制作用を支えており、BCAA濃度が低下すれば、インスリンによる蛋白分解抑制作

用が著しく低下するという。

骨格筋内¹⁵N量はCCl₄ラットでは¹⁵N-Leu群が¹⁵N-Val群に比し有意の高値を示し、Leuが有効に取り込まれ、利用されていることがうかがえる。CCl₄ラットでは血漿IRI値が¹⁵N-L-Leu投与後に明かに上昇したこともLeuの組織内取り込みを増大させた一因と考えられる。

尿中¹⁵N排泄率からみると、過剰に投与されたLeuに基づく窒素はValのそれより速やかに排泄されることが示された。

要 約

1. 対照ラットとCCl₄急性肝障害ラットに、¹⁵N-L-Leuおよび¹⁵N-L-Valを胃内に単回投与して血漿、骨格筋および脳内遊離アミノ酸濃度と¹⁵Nの利用を比較検討した。
2. CCl₄ラットでは、血漿Leu濃度の上昇の遅延とVal濃度の著明な上昇が認められ、対照ラットに比しLeu吸収とVal代謝が低下しているものと推測された。
3. 絶食時のCCl₄ラットの骨格筋遊離アミノ酸とくにBCAA濃度は高値であるが、¹⁵N-L-Leu投与後にLeu、IleとMetが低下し、Leuによる蛋白分解の抑制が示唆された。
4. CCl₄ラットの骨格筋内¹⁵N量は¹⁵N-Leu群が¹⁵N-Val群より高値で、Leuの利用率が高いことがうかがえたが、これにはインスリンの影響も考えられた。
5. CCl₄ラットの尿中¹⁵N排泄率は¹⁵N-Leu群が5時間後に有意の高値を示し、過剰に投与されたLeuはValより速やかに代謝され排泄され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

- 1) Tischler, M.E., Desantels, M., Goldberg, A.L.: Does leucine, leucyl-tRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle? *J. Biol. Chem.*, 257: 1613-1621 (1982).
- 2) Blackburn, G.L., Moldawer, L.L., Usui, S., Bethe, A., O'keefe, S.J.D., Bistrian, B.A.: Branched-chain amino-acid administration and metabolism during starvation, injury and infection. *Surgery*, 86: 307-315 (1979).
- 3) Naylor, C.D., O'Rourke, K., Detsky, A.S., Baker, J.P.: Parenteral nutrition with branched-chain amino acids

献

- in hepatic encephalopathy. A meta-analysis. *Gastroenterology*, 97: 1033-1042 (1989).
- 4) Okita, M., Watanabe, A., Nagashima, H.: Effect of branched-chain amino acid on ^{15}N incorporation into liver and skeletal muscle protein following [^{15}N]-ammonium chloride administration to carbon tetrachloride-intoxicated rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 34: 85-96 (1988).
 - 5) 野村武則, 小田桐玲子, 出村れい子, 明石弘子, 出村 博: 二抗体固相法によるインスリンRIAキット(シオノギSD-8566)の基礎的検討および臨床的応用。ホルモンと臨床, 32: 573-578 (1984)。
 - 6) Adibi, S.A., Allen, E.R.: Impaired jejunal absorption rates of essential amino acids induced by either dietary caloric or protein deprivation in man. *Gastroenterol.*, 59: 404-413 (1970).
 - 7) 武藤泰敏: 消化・吸収, 第一出版, 東京, p.236 (1988)。
 - 8) Staten, M.A., Bier, D.M., and Matthews, D.E.: Regulation of valine metabolism in man: a stable isotope study. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 40: 1224-1234 (1984).
 - 9) Ichihara, A., Koyama, E.: Transaminase of branched chain amino acids: 1. Branched chain amino acids- α -ketoglutarate transaminase. *J. Biochem.* 59: 160-169 (1966).
 - 10) Shinnic, F.L., Harper, A.E.: Branched-chain amino acid oxidation by isolated rat tissue preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, 437: 477-486 (1976).
 - 11) F-Steed, M., Warner, M.L., Bulus N., Flakoll, P., Abumrad N.N.: Role of insulin and branched-chain amino acids in regulating protein metabolism during fasting. *Am. J. Physiol.*, 258: E907-917 (1990).

平成3年3月16日受付

平成3年4月26日受理