Protein Metabolism in Diabetes Mellitus

I. Urinary Amino Acid Excretion

By

Nobuo SAKAMOTO

3rd Department of Internal Medicine, University of Nagoya, School of Medicine

(Director: Prof. Kozo Yamada)

Although numerous investigations on metabolic disturbances in diabetes mellitus have been made, little is known of abnormalities of protein metabolism especially of amino acid metabolism in diabetics.

As the first step to clarify metabolic disturbances of amino acids in diabetes mellitus, urinary amino acid excretion was investigated. Comparing amino acid patterns of normal subjects with those of diabetics, the author gained following results:

- (1) Urinary amino acid excretion is decreased in diabetics especially those with ketoacidosis.
- (2) Excretion of lysine, arginine, histidine, threonine are strikingly decreased.
- (3) Decreased amino acid excretion is recovered to a normal range by administration of insulin, but not by other therapeutics.

Mode of Action of ACTH on the Adrenal Cortex as Determined by Morphological Observation

By

Atsushi YOKOSUKA

Dept. of Hist. and Embry. Tokyo Jikei-kai School of Med., Minato-ku, Tokyo

(Director: Prof. Fujio Yoshimura)

In present investigation, the maintenance test of ACTH was performed in order to elucidate the mode of action of this principle to the adrenal cortex as determined by the cytological observation. In the first group, the hypophysectomized male adult rats of Wistar strain were sacrificed at the 5th, 10th, 14th and 30th postoperative day as the control. The second group consisting of hypophysectomized rats was subcutaneously injected with ACTH 2.5mg/day/rat from the next day for 5, 10, 14, 30 days respectively. Each day-subgroup of hypophysectomized control consisted of 2-6 rats and hypophysectomized administered day-subgroup consisted of 2-3 rats. Materials removed immediately after the decapitation were fixed with Levi's solution and the paraffin sections obtained were stained with Heidenhain's iron hematoxylin. In preceding paper (1957) the author appointed the automacity of zona glomerulosa which may be responsible for the hyperactivity induced by the hypophysectomy, because of the fascicle formation and the accumulation of proteinic stainable granules within the cell-bodies. Present cytological alterations in the adrenal cortices following the hypophysectomy were reconcile in general with the descriptions in foregoing article, so a references is to be made to those data in it.

糖 尿 病 の 蛋 白 質 代 謝

(第1報) 尿中遊離アミノ酸について

名古屋大学医学部第三内科教室 (主任 山田弘三教授)

坂 本 信 夫

本論文の要旨は日本内分泌学会第6回西日本地方会および第2回日本糖尿病学会討議会において発表した。

目 次

第1章 緒 言	f) 結晶アミノ酸溶液負荷試験
第2章 実験方法	g) 動物実験
1. 尿中遊離アミノ酸検出法の検討	h) アミノ酸パターンの判定方法
2. 実験方法	第3章 実験結果
a) 原 理	1. 1日尿における尿中遊離アミノ酸
b) イオン交換樹脂	2. 必須アミノ酸結晶溶液負荷実験
c) 尿の前処理	3. 家兎尿中アミノ酸
d) 尿の処理	第4章 考 按
e) 尿中遊離アミノ酸の検索	第5章 総 括

第1章 緒 言

近年生化学の進歩に伴い各種疾患の物質代謝面よりの追及がさかんになった。糖尿病においても糖質代謝は勿論脂質代謝も漸次究明せられその異常がようやく強調せられるに至つた。しかしながら蛋白代謝についてはその重要性が強調せられるに拘らず今日全く不明というばかりはない。また蛋白質の前駆体ないし代謝産物たるアミノ酸代謝についても同様である。個々のアミノ酸代謝については生化学的に漸次究明されているがその異常を臨床的に追究した報告は数少い。糖尿病時におけるアミノ酸代謝異常に関する研究は未だ殆んど接することが出来ない。

アミノ酸と糖尿病の重大な関連は古武およびその一門¹⁾²⁾のキサンツレン酸による実験的糖尿病に関する広汎な研究からもうかがわれる。

すなわちシロネズミを高脂肪食にて長期飼育することにより体内 V・B₆ 欠乏状態が惹起されその結果アミノ酸の異常代謝が起りトリプトファンよりキサンツレン酸が生成せられるに至る。このキサンツレン酸が強い diabetogenic action を示しキサンツレン酸投与動物は持続性高血糖ならびに糖尿を呈するに至るといふ。

また従来糖尿病時においては窒素平衡が負になることが多いことが指摘されているがこの事実に徴しても糖尿病が糖質代謝のみならず蛋白代謝ひいてはアミノ酸代謝にも著るしい障害をきたすことは明らかである。

著者は糖尿病時におけるアミノ酸代謝異常究明の一手段として糖尿病患者のアミノ酸尿を追究し興味ある二、三の所見を得た。

第2章 実 験 方 法

1 尿中遊離アミノ酸検出法の検討

アミノ酸尿 Aminoaciduria に関しては近年数多くの報告があるが、Fowler, Norton ら³⁾も指摘することく

その成績は全く不定である。彼らは尿中遊離アミノ酸分析方法の相違によることが最大の原因であると指摘している。

尿中遊離アミノ酸検索法としては枚挙に遑なき先人諸家の研究があるがなお絶対的といえる方法はない。各アミノ酸を分別定量する方法として今日広く行われる Moore and Stein 法⁴⁾⁵⁾はイオン交換樹脂を応用して各種の生体材料よりアミノ酸を個別分離し定量しうる点で画期的な業績といえるがその手技の複雑さのために臨床的に応用することは至難である。

臨床的に応用出来る方法としては paper partition chromatography による方法が最も簡便である。これは被検材料が純粋のアミノ酸混合溶液の場合には極めて満足さるべき方法といえるが夾雑物が存在すればアミノ酸の展開が甚しく妨害される。特に蛋白と塩類は強い障害となる。

原尿をそのまま或は濃縮して paper chromatography を行つた報告^{9)~10)}が散見されるがこれらは古典的方法とも称すべく今日はほとんど顧られない。いずれも尿に含まれる種々の物質によつてアミノ酸の濾紙上の展開が甚しく妨害されるためである。

70%アルコールによる除塩法^{11)~13)}も広く応用されているが sulfonated polystyrene resin によるアミノ酸分離法が Moore⁴⁾により提唱されるに及び今日では最も広く行われる方法となつた。しかしながら本法は前述のごとくその操作が簡単でない。

ここにおいてイオン交換樹脂を応用して除塩ししかる後 paper chromatography を行う倉橋蘭田氏法¹⁴⁾が最も簡便かつ正確と思われる。尿中遊離アミノ酸の検索にはこの方法に準じて以下のごとき操作を行つた。

2 実験方法

主として倉橋、蘭田氏法¹⁴⁾に準じて行つた。

a) 原理

被検尿を除塩の目的を以て陽イオン交換樹脂次いで陰イオン交換樹脂を順次通過せしめる。この際アミノ酸は両性イオンであるために前者にては陽イオン後者にては陰イオンとそれぞれ分別され可成り純粋の状態にて得られることとなる。

得られた被検液を減圧下に濃縮後その一定量について二次元 paper chromatography を行い被検尿のアミノ酸パターンを作成する。

b) イオン交換樹脂

陽イオン交換樹脂は Amberlite IR 120 (100mesh) をHR型となして内径 2.5cm 高さ 100cm の glass column 中に 250g を充填して用いる。

陰イオン交換樹脂としては Dowex 2 (50meh) 250g を ROH 型となして上記同様の glass column に充填して用いる。

c) 尿の前処置

目的に応じて24時間蓄尿あるいは一定時間内蓄尿を用いる。24時間尿の場合においては1日尿量の1/2容を用いその他の場合は全量を用いた。これは尿量の変動に伴う稀釈を避けるためである。尿蛋白陽性の場合には除蛋白後所定量をとる。尿は可及的速やかに処理する。

d) 尿の処理

被検尿を弱酸性となし2cc/min. の速度で陽イオン交換樹脂カラムに滴下する。滴下終了後酸性となつた流出液が中性となる迄蒸留水で洗う。ついで 2N-NH₄OH を2cc/min. の速度で滴下し陽イオン交換樹脂に吸着せられたアミノ酸を溶出する。通常 2~3l の溶出液が得られた。

溶出液はアルカリ性を呈する故に可及的に低温で減圧濃縮し 500cc 前後とする。溶出液はアルカリ性より中性となる。これは次の陰イオン交換樹脂に 2cc/min. の速度で滴下吸着せしめた後アルカリ性となつた流出液が中性を呈する迄水洗する。吸着したアミノ酸は 2N-HCl を2cc/min. の速度で滴下して溶出する。通常 1~1.5l の溶出液を得る。溶出完了は Ninhydrin 反応を溶出液について行い確認する。

この溶出液を減圧下に濃縮乾固せしめるが出来うる限り HCl を除去するために水を加えて反覆行いまた

Peptide の加水分解を防止するため可及的に低温で行った。被検液濃縮後除去し得なかつた夾雑物を除くため濾過し濾液を乾固せしめる。残渣を10ccの水に溶解して試料とする。

e) 尿中遊離アミノ酸の検索

以上のごとくして得た試料の0.004ccを展開液とし二次元 paper partition chromatography を行つたがアミノ酸液負荷実験および動物実験に際しては0.01ccを用いた。濾紙としては東洋濾紙 No. 50 (40×40cm)を用いた。一次元二次元ともに上昇法を用い密閉した大型 Glocke 内で展開した。

溶媒については先人諸家により各種のものが推奨されているが^{15)~20)}、一次元溶媒には水：氷酢酸：n-ブタノール混液（混合比1：1：4）二次元には80%フェノールを用いた。

なおアミノ酸と重金属の錯塩形成を阻止する目的をもつてフェノール中には0.1%アムモニアを入れた小コルベンを挿入した。

展開終了後室温で濾紙を乾燥しこれに0.2%ニンヒドリンブタノール溶液を噴霧し100°C 5分間加温発色せしめる。かくして得たアミノ酸パターンの各スポットに就き純品アミノ酸標本を用いて比較同定した。

f) 結晶アミノ酸溶液負荷試験

被検者はアミノ酸溶液投与前12時間以上絶食せしめ投与直前排尿せしめた。

早朝空腹時下記組成を有する必須アミノ酸結晶溶液（市販品）20ccを肘静脈より注射し以後3時間内の排尿を集めて試料とした。尿量を可及的に一定にするために静脈内投与の前に500cc前後の水を摂取させた。通常200ないし300ccの蓄尿を得た。

試料の処理は前述の方法と全く同様である。

必須アミノ酸結晶溶液の成分%

L-Arginine · HCl	0.800	L-Threonine	0.330
L-Histidin · HCl · H ₂ O	0.400	DL-Threonine	0.420
L-Isoleucine	0.780	DL-Tryptophan	0.180
L-Leucine	1.750	L-Valine	0.610
L-Lysine · HCl · 2H ₂ O	1.460	Glycine	1.000
L-Methionine	0.500	Nicotinamid	0.020
L-Phenylalanine	0.870	合 計	9.120

以上1日尿についての検索及びアミノ酸溶液負荷実験何れの場合においても被検者は肝および腎の機能検査で異常をみとめない者を選んだ。これは可及的に肝および腎の影響を避けるためである。

g) 動物実験

体重1.8~2.2kgの雄性家兎を400gのオカラおよび十分量の野菜で数日飼育し尿量がほぼ一定になってから下記処置をほどこした。

家兎10羽を5羽宛2群となし1群を対照1群を被検群となす。被検群に対しAlloxan 200mg/kg bd.wt.を耳静脈より注射実験の糖尿病を起せしめた。糖尿出現を待つて各群より1日蓄尿を分離前述の方法に拠り除塩後型の如くPaper chromatographyを行つた。

家兎尿は多量の無機塩とともに炭酸塩を多量に含み酸性mediumに於いて多量のガスを発生する。従つて陽イオン交換樹脂通過に際しては予め尿を酸性化して充分CO₂を発生せしめる必要がある。また家兎尿の尿中遊離アミノ酸はStave²¹⁾も指摘するごとく極めて少くわずかにCystine, Glutamic acid, Glycineなど2~3種を数えるに過ぎない。それ故イオン交換樹脂通過乾固後残渣を5ccの水にとかし濾過濾液を等量の5N-HClと共に封入管中に入れ100°C48時間加水分解した。水解完了後水を加えて反覆濃縮し可及的にHClを除去乾固せしめたる後残渣を2ccの水に溶解して展開試料とした。

Paper chromatography は人尿試料の場合と全く同様である。

家兎においてもアミノ酸溶液負荷実験を行つたが投与せる結晶アミノ酸溶液は人に使用せるものと全く同じものである。被検家兎を負荷前24時間絶食せしめた後耳静脈より該アミノ酸溶液を注入した。以後6時間尿を蓄尿し試料とした。試料の処理は1日尿の場合と同様である。

第1図 健康人尿中遊離アミノ酸

1. Cystine	10. Valine
2. Aspartic acid	11. Leucine, Isoleucine
3. Glutamic acid	12. Methionine
4. Serine	13. Lysine
5. Glycine	14. Histidine
6. Threonine	15. Arginine
7. Alanine	S_1 } 不明
8. β -Alanine	S_2 }
9. Tyrosine	

h) アミノ酸パターンの判定方法

上記方法に拠つて得られたアミノ酸パターンについては各スポットの表現するアミノ酸の種類は明確に認めることが出来るがあくまで質的の面についてのみである。もちろん量的に被検尿を一定方式に従つて処理し最後に一定量に稀釈しかつその一定量を展開したことにより或程度量的検索に資することが出来る。しかし絶対値を知ることは不可能でありただ単にその消長を知り得るに止まる。

従つて判定に当つては肉眼的に(卅)(+)(+)(±)(-)の5段階に分けて記録した。すなわち健康者尿の示す各種アミノ酸スポット各々につき各例の中で最大の発色度拡がり示すものおよびそれに準ずるものを(卅)とする。スポットとして明瞭に認めうるもののうち最小のものを(+)とし(卅)と(+)の中間のものを(++)とする。僅かに認め得るRf値を勘案しスポットと断定して差支えなきものは(±)認められないものを(-)とした。

第3章 実験結果

1) 1日尿における尿中遊離アミノ酸

被検対象は糖尿病39例健康人6例である。

健康人の示すアミノ酸パターンを総括すれば図1のごとくなる。

Histidine, Glycine, Serine, Alanine のスポットが最も大きく次いで Threonine, Glutamic acid, Lysine, Aspartic acid, Arginine, β -Alanine が明瞭にみとめられる。Cystine の示すスポットは最も小さい。

図2, 3, 4 糖尿病患者尿中遊離アミノ酸

第2図

第3図

第4図

第5図 インシュリン治療による尿中アミノ酸推移の1例

しく減少するのがみとめられる。

健常者糖尿病患者両群について実験方法b)項に示した判定基準に従って分類した結果を総括すれば表1のごとなる。

1例平均出現スポット数は糖尿病群においては5.43を示し健常者に比して半減する。

興味あることは未治療群治療群に分けて観察するに未治療群

第6図 インシュリン治療による尿中アミノ酸推移の1例

では平均スポット数4.09であるに反し治療群では未コントロール群5.44コントロール群6.67を示し糖尿病の好転と共にスポット数の回復がみられる。

症例7, 10, 11は Ketosis 傾向強く尿中アセトン(卅)を示した例であるがこれらにおいてはその尿中遊離アミノ酸は極度に減少し殊に10, 11例では全く認められなかつた。

治療群では一般に尿中遊離アミノ酸の回復がみられることは上述の通りであるが特にインシュリン治療による場合にこの傾向が顕著である。なかんずくインシュリンによるコントロール群では平均スポット数8.75を示し最高の出現率がみとめられる。

インシュリンによる尿中遊離アミノ酸の排泄推移状況を図示すれば図5, 6の如くである。

この例は何れも高度の Ketosis を有し治療前には全くアミノ酸のスポットを認めえなかつたがインシュリン治療により漸次回復をみるに至つたものである。

これに対して経口剤 (主として Penethyldiguanide による場合は臨床的にコントロールされた状態においても治療前と有意の差はない。

インシュリン, 経口治療剤併用群ではインシュリン単独群に比して回復が不良であるがこれは併用治療をうけた症例が重症で Ketosis 傾向の強い例であつた事に起因すると思考せられる。したがつて併用がインシュリン単独に比して回復が遅れるとは断言できない。

以上の現象をアミノ酸の種類について観察すれば表2のごとくである。

表2 1日尿中遊離アミノ酸出現率

	健 常 者 (6例)						糖 尿 病 (39例)						健 常 者 の 出 現 率 を 100%とした時の出現率
	卅	++	+	±	—	出現率	卅	++	+	±	—	出現率	
シ ス チ ン	1	0	5	0	0	100.0%	0	0	14	7	18	35.9%	(26.8)
グルタミン酸	1	5	0	0	0	100.0	1	11	15	5	7	79.2	
アスパラギン酸	1	1	4	0	0	100.0	0	7	14	12	6	53.9	
セ リ ン	1	3	2	0	0	100.0	1	15	6	3	14	56.4	
グ リ シ ン	5	1	0	0	0	100.0	13	18	3	1	4	87.0	
ス レ オ ニ ン	2	0	2	1	1	66.6	0	1	6	9	23	17.9	
ア ラ ニ ン	5	1	0	0	0	100.0	6	21	6	2	4	84.8	
β-ア ラ ニ ン	1	3	2	0	0	100.0	0	2	6	11	20	21.0	
リ ジ ン	1	6	0	0	0	100.0	1	2	4	17	15	17.9	
ヒ ス チ ジ ン	3	3	0	0	0	100.0	1	4	12	17	5	43.6	
アルギニン	3	2	0	1	0	83.3	0	1	9	13	16	25.6	(30.7)
メチオニン													(30.7)
ロイシニン	1	1	3	0	1	83.3	0	4	6	8	21	25.6	
イソロイシン													
そ の 他	1	0	2	1	2		0	3	7	9	20		

糖尿病群と健常者群と比較して出現率に最も著しい差がみられるものは Lysine であり次いで β-Alanine, Threonine, Arginine, Cystine, Histidine の順序に差が甚だしい。Glycine, Alanine, Glutamic acid には殆ど差がない。

Methionine, Leucine, Isoleucine, Tyrosine 等については出現が不定であるため比較は意味がない様に思われる。

(小 括)

1日尿中遊離アミノ酸を健常人と糖尿病患者について比較検討するに

- (1) 糖尿病患者尿中遊離アミノ酸は健常人に比し著しく減少し病状の程度に応じてその減少度も著しい。
- (2) 病状の回復に応じてアミノ酸排泄状況も回復するがインシュリン投与による影響が最も強く経口剤に

表3 アミノ酸溶液負荷3時間尿中遊離アミノ酸

		非コントロール群				コントロール群				健 常 者		
		経 口 剤		インシュリン使用		経 口 剤		インシュリン使用				
性 別	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	
氏 名	篠 ○	小 ○	越 ○	石 ○	小 ○	林 ○	川 ○	石 ○	千 ○	小 ○	坂 ○	
シ ス チ ン	+	+	卅	+	卅	+	卅	+	+	±	卅	
グルタミン酸	+	—	—	+	—	—	卅	卅	+	—	卅	
アスパラギン酸	+	+	+	卅	+	±	±	卅	+	—	卅	
セ リ ン	+	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	
グ リ シ ン	+	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	
ス レ オ ニ ン	—	—	—	—	—	±	—	—	卅	卅	卅	
ア ラ ニ ン	—	±	±	卅	—	±	卅	卅	卅	卅	卅	
β-ア ラ ニ ン	±	—	±	+	—	—	—	—	—	—	—	
リ ジ ン	±	±	+	±	±	±	+	—	卅	卅	卅	
ヒ ス チ ジ ン	±	—	±	±	±	±	+	卅	卅	卅	卅	
アルギニン	±	—	±	—	±	—	—	±	+	+	卅	
メチオニン	—	—	—	卅	—	—	—	卅	—	—	卅	
イソロイシン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
そ の 他	—	±	—	+	—	—	—	卅	—	±	卅	
ス ポ ット 数	5	4	5	6	4	3	7	9	10	8	12	
	4.5		7.0		3.5		8.0		10.0			
	5.75				5.75							
	5.75											

表4 アミノ酸溶液負荷3時間尿中遊離アミノ酸出現率

	健 常 者(3例)						糖 尿 病(8例)					
	++	++	+	±	—	出現率	++	++	+	±	—	出現率
シ ス チ ン	1	1	1	0	0	100.0%	3	0	5	0	0	100.0%
グルタミン酸	1	0	1	0	1	66.7	2	0	4	1	1	75.0
アスパラギン酸	1	2	0	0	0	100.0	1	1	4	2	0	75.0
セ リ ン	3	0	0	0	0	100.0	1	5	2	0	0	100.0
グ リ シ ン	3	0	0	0	0	100.0	2	4	2	0	0	100.0
ス レ オ ニ ン	2	1	0	0	0	100.0	0	0	0	1	7	0
ア ラ ニ ン	3	0	0	0	0	100.0	2	1	0	2	3	37.5
β-ア ラ ニ ン	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	5	11.2
リ ジ ン	2	1	0	0	0	100.0	0	0	2	5	1	25.0
ヒ ス チ ジ ン	3	0	0	0	0	100.0	0	1	1	5	1	25.0
アルギニン	1	0	2	0	0	100.0	0	0	0	4	4	0
メチオニン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
イソロイシン	1	0	0	0	2	33.3	2	0	0	0	6	25.0
そ の 他	1	0	0	1	1	33.3	1	0	1	0	6	25.0

よる回復は殆んど認められない。

(3) 有意の差を示すアミノ酸は Lysine, β -Alanine, Threonine, Arginine, Cystine, Histidine であり, Glycine, Alanine, Glutamic acid には殆ど差を認めない。

2) 必須アミノ酸結晶溶液負荷実験

アミノ酸溶液の負荷試験を行つた被検対象は糖尿病 8 例健常人 3 例である。

それぞれの出現率出現状況は表 3, 4 図 7 に総括せるごとくである。

第 7 図 必須アミノ酸溶液負荷 3 時間
尿中アミノ酸

(a) 健常者

(b) 糖尿病患者 (例 1)

(c) 糖尿病患者 (例 2)

1 例平均出現スポット数は健常人 10.0 糖尿病患者 5.75 を示し 1 日尿における夫々の値とほとんど差異はない。

アミノ酸尿中出现状況における両群の差は Arginine, Threonine, Lysine, Histidine, Alanine の順に著しく Serine, Glycine, Cystine, Glutamic acid, Aspartic acid などには有意の差が認められない。

β -Alanine は 1 日尿の場合とは逆に健常人においてその排泄は殆ど認められないに反して糖尿病患者に出現をみることがある。しかしながらこの点は更に例数を重ねて検討を要する。

注目すべきことは負荷試験においては未コントロール群およびコントロール群の間に 1 日尿における

第 8 図 家兎尿中アミノ酸(水解後)

正常家兎

正常家兎

(c) アロキサン糖尿家兎

{ 2日目
空腹時血糖(測定不能)
アセトン尿(++)

(d) アロキサン糖尿家兎

{ 5日目
空腹時血糖 398mg/dl
アセトン尿(++)

(e) アロキサン糖尿家兎

{ 23日目
空腹時血糖 198mg/dl
アセトン尿(±)

(f) アロキサン糖尿家兎

{ 53日目
空腹時血糖 114mg/dl
アセトン尿(-)

場合のごとき明瞭な差がみられず単にインシュリン使用の有無により差がみられる事である。すなわち治療群中コントロール群の5.75と全く差がない。しかるにコントロール如何に不拘インシュリン治療をうけている4例では平均7.5を示しインシュリン投与を受けない4例平均4.0と比し約倍増する。

(小括)

(1) 糖尿病患者は健常人に比してアミノ酸溶液負荷後3時間尿においてもアミノ酸排泄は減少している。両群の差は Arginine, Threonine, Lysine, Histidine, Alanine に著しい。

(2) 負荷試験においては糖尿病のコントロールの有無には関係なくインシュリン投与非投与群間に差がみとめられる。

3 家兎尿中アミノ酸

家兎は尿中に遊離アミノ酸をほとんど排泄しないため加水分解の操作を加えて検討した。

正常家兎における水解後尿中アミノ酸は図8a, bに示すごとくである。これに明らかなごとく家兎においても主要なるアミノ酸は出現しそれぞれ同定しうがその他に多数のニンヒドリン陽性物質の出現がある。これら多数のスポットは或は未知の或は既知のスポットと相互に overlap して多様かつ複雑なるパターンを形成し一定の傾向を認めがたい。したがって人尿におけるごとく分析は不可能に近かつ意義が少いので出現率による分析は省略した。

アロキサン糖尿家兎においても人糖尿病と同じく出現するアミノ酸お

よびニンヒドリン陽性物質の数は正常家兎に比して激減するのが認められた。殊にアロキサン投与後高血糖はなほだしく尿中アセトンが著明に証明せられる時期に於いてはスポットが殆んど認められない。この現象はアロキサン糖尿の自然回復とともに正常状態に回復する(図8c, d, e, f)。

1日尿における現象は上述の如く人の場合と同様な傾向がみられるがアミノ酸溶液負荷後6時間尿におい

第9図 必須アミノ酸結晶溶液負荷6時間尿中アミノ酸

ては予想に反して両者間に特記すべき差異が認められなかつた(図9)。

(小 括)

(1) 水解後家兎1日尿中アミノ酸はアロキサン糖尿家兎尿において減少する。その程度は人と同様病勢の高度のもの程著しく自然回復と共にアミノ酸パターンも正常に復するのが認められた。

(2) アミノ酸負荷後6時間尿中アミノ酸パターンでは正常およびアロキサン糖尿家兎間に著しい差は認められなかつた。

第4章 考 按

従来 Aminoaciduria が臨床的に注目されたのは肝腎疾患および特殊な代謝障害時におけるものでそれらに就いては種々の報告がある。

いずれの場合においても尿中遊離アミノ酸の増加が異常である。

Dunn²¹⁾等はアミノ酸の増加の要因として 1) 肝におけるアミノ酸利用能の低下, 2) 組織崩壊の増加, 3) 生体酸化の増進, 4) 腎再吸収の低下, 5) アミノ酸の imbalance 等をあげアミノ酸尿減少の要因として各項の逆をあげている。

臨床的にも病理学的にも腎性アミノ酸尿が興味を持たれているが之はアミノ酸の尿細管部に於ける再吸収に関係があるためである。その代表例として知られるものに Fanconi' syndrome²²⁾がある。これは高度の generalized aminoaciduria と共に糖尿を呈する点に興味を持たれるが遺伝性の代謝障害を有し尿細管部における再吸収機構に重大な欠陥を有することが今日認められている。

また Wilson's disease (Hepatolenticular degeneration) 時における腎性アミノ酸尿も古くから注目をうけている^{23)~26)}。

これらの腎性アミノ酸尿に関しては細胞代謝面より追及した Stave の研究²⁷⁾があり詳細な検討が加えられている。

一方肝疾患時におけるアミノ酸尿についてもいろいろの研究が行われているが²¹⁾²⁸⁾²⁹⁾その究極的な原因は解明出来ぬ迄もアミノ酸代謝における肝の重大なる役割を考え合せ理解しうるところである。

Flock³⁰⁾の指摘するごとく生命に対して絶対的の意義をもつ蛋白質が肝において代謝されまた同時にアミノ酸の生体内代謝の重要な部分が肝において行われる事実は血中尿中を問わずアミノ酸の消長はその起源の大部分を肝に求め得べきことを示唆する。

糖尿病患者においては一般に尿中アミノ酸特に塩基性アミノ酸および Threonine が特異的に減少するという事実が肝の関与によるものかあるいは腎の再吸収機構の異常によるものかは俄かに断定することは出来ない。

しかしながら尿中に disproportionate aminoaciduria の見出される場合は肝障害に基づくものと考えらるべきであるとする従来の研究業績²³⁾²⁹⁾や糖尿病時には特異的な腎障害は認められない事アミノ酸クリアランスに関する Doolan ら³¹⁾の詳細なる研究において塩基性アミノ酸クリアランスに特に指摘すべき特異性のないことさらには糖尿病自体が糖質脂質蛋白質の中間代謝過程の障害でありその中間代謝は殆んど肝において行われる事など考え合わせて今回報告せる現象も主として腎前性要因に基づくものと考えるのが妥当と思われる。

未処置の糖尿病患者ならびにアロキサン糖尿家兎においてアミノ酸排泄減少があられるが Acidosis 傾向の強いもの程その度の強い事またそれらが Insulin 投与によつて漸次正常状態に復する事実などは Insulin の不足にもとづいて高度の Gluconeogenesis が引き起されアミノ酸プールが極度に減少するためと考えることによつて理解せられる。かかる見解は Bearn³²⁾らの主張とよく一致する。

蛋白質およびアミノ酸の体内利用には内分泌のもつ意義が甚だ大であることは Milman³³⁾らの指摘を俟つまでもないが彼らは蛋白質の利用能力に Androgen, Growth hormone などと共に Insulin が大なる意義を有すると主張している。

生体に必要なるカロリーが充分供給されている場合にはアミノ酸は体蛋白の spare となり得るが供給が不十分な場合にはアミノ酸はエネルギー供給源として消耗せられることになる³⁴⁾。この一部が糖尿病時の Gluconeogenesis の亢進として認められている。すなわち糖分解が順調に行われる場には Acetyl-CoA の生成も順調で TCA cycle の廻転が良好となり臓器組織の機能は良く発揮され組織蛋白の分解は抑制される。糖尿病時には糖質の利用低下により二次的に蛋白の分解が促進され蛋白の代謝は Gluconeogenesis へと進展してゆくこととなる。Insulin の不足自体に基づく蛋白合成障害がこれに拍車をかけと思われる。

Insulin 分泌不足にもとづく糖尿病においては Ketosis, Acidosis, 負の窒素平衡を惹起してくることは周知の事実である。かかる不安定糖尿病患者において亢進せる Gluconeogenesis は Insulin 治療により急速に減退することが Bearn らの肝静脈カテーテルによる実験で証明せられたという³²⁾また Lotspeich³⁵⁾は実験的に Insulin の注射によつてイヌの血中アミノ酸は減少し筋肉内アミノ酸の増量がみられることを認め、Insulin の蛋白合成促進作用を主張している。

以上の事実は糖尿病時殊に Ketosis の存在する不安定糖尿病時においては体内アミノ酸プールの強い減少を惹起する可能性を示すものであり著者の今回報告せる尿中遊離アミノ酸減少の事実とよく符合するといえる。また Insulin 投与によつてアミノ酸プールの回復がみられる事実は Insulin 治療をうけて糖尿病がコントロールされるにつれ尿中アミノ酸パターンが正常に復することおよびアロキサン糖尿家兎の尿中アミノ酸パターンが自然回復に応じて正常に復するという著者の報告を裏書きするに足るものである。

しかしかかる現象が Insulin の不足によつて惹起された Gluconeogenesis の昂進によつてのみ説明する事には困難がある。

従来 glycogenic な Amino 酸として比較的糖代謝に移行しやすいと看做された Glycine, Serine, Glutamic acid, Aspartic acid などの減少が少なくかえつて nonglyco-nonketogenic なアミノ酸と目される Histidine, Lysine が強く減少するという矛盾に逢着する。もちろんその nonglycogenic ないし glycogenic なる表現が絶対的意義をもつものでなく Histidine, Arginine が α -Ketoglutarate を経て TCA cycle に入りうることは広く認められている。

しかしながら塩基性アミノ酸および Threonine よりの Gluconeogenesis が他のアミノ酸よりの Gluconeogenesis に比して容易に行われるという確証は全くない。今日信ぜられるところによればむしろ逆の見解が正しいと思われる。

以上の事実は糖尿病において尿中遊離アミノ酸排泄減少をきたす原因の一部はアミノ酸よりの糖新生亢進に求め得べきものであるにしてもそれがすべてではないことを示している。

Lysine, Arginine, Histidine が他のアミノ酸と異なる点はその構造が六炭素塩基性 (いわゆる Hexonbase) を示すことであつていずれも 2 個以上のアミノ基を有している。このことがインシュリン欠乏状態下の生体

にとつて重要な意義を有するものと推定せられるが栄養学的にも Lysine, Histidine はいわゆる必須アミノ酸に属し Arginine また Guanidine 基の存在より代謝学上特異的な地位を占めるものである。また Threonine も糖質への転化は非可逆的に行われること必須アミノ酸であること代謝過程の大部分にピロキサルリン酸の関与を受けることなど特異的な存在である。

かかる特異性と尿中アミノ酸パターンにみられる特異性が如何なる意味に於いて関連するかはなお今後の研究に俟たねばならない。

1 日尿と負荷後 3 時間尿の両者において共通に減少するアミノ酸は Lysine, Arginine, Histidine の塩基性アミノ酸および Threonine であり, Glutamic acid, Cystine, Aspartic acid, Serine, β -Alanine は負荷実験においては差がみられない。

β -Alanine, Glutamic acid にはむしろ健常人を凌いで排泄増加する傾向すら窺われる。

アミノ酸が Schwellenstoffe に属する以上血中アミノ酸濃度したがつて原尿中アミノ酸濃度が再吸収に対する最大値を超える場合 overflow によつて尿中アミノ酸が増加するのは異とするに当たらない。しかしながら負荷せるアミノ酸溶液には増加せるアミノ酸は含まれていない以上閾値を超す血中濃度に達するとは考えられない。尿細管部における再吸収の際アミノ酸相互にみられる競り合い現象により塩基性アミノ酸および Threonine が優先的に吸収されるために他のアミノ酸の排泄増加傾向が惹起するとの説明は妥当である。しかしながらこれは Doolan らの詳細な研究結果と矛盾する。

即ち彼等によればアミノ酸負荷時には Arginine, Alanine は他のアミノ酸に比してよく再吸収されるが Threonine, Lysine はむしろ再吸収され難いという³⁶⁾。

以上の事実からアミノ酸負荷時におけるアミノ酸排泄増加傾向は腎性要因に基づく現象とは考えるは妥当でない。

アミノ酸負荷実験においても Insulin 投与の有無が重大な意義を有することが注目値する。アミノ酸溶液の膵内投与が血糖量を減少せしめることは既に広く知られた事実である。これはアミノ酸投与が膵 Langarhans 島を刺激して Insulin の分泌を促すためと説明されている³⁷⁾。この説の真偽には尚疑問があるが事実とするならばアミノ酸負荷実験における尿中アミノ酸排泄増加傾向を矛盾なく説明し得ることとなる。

以上糖尿病時におけるアミノ酸代謝の一面としての尿中遊離アミノ酸研究の結果を報告しそれについて二三の考察を加えた。しかしながらこれらは今日では未だ仮説とも称すべくこれの最終的解明までには尚解決すべき数多くの問題が残されている。すなわち血中尿中遊離アミノ酸およびアミノ窒素の定量的研究糖尿病時における各アミノ酸の中間代謝の厳密なる追及が静的のみならず動的にも行われねばならない。今後の研究の成果が待たれる所以である。

第5章 総 括

糖尿病時における尿中遊離アミノ酸の異常を 1 日尿と必須アミノ酸結晶溶液負荷 3 時間尿およびアロキサ糖尿家兔尿について追究し次の如き所見を得た。

- (1) 糖尿病においては尿中遊離アミノ酸は種類量共に健常者に比して減少する。
- (2) アミノ酸減少度は糖尿病の病勢に応じて強くなり病状の好転と共に正常に回復する。
- (3) 正常への回復には Insulin 投与が必須であり他の糖尿病治療剤は大なる影響を与えない。
- (4) 健常者尿と糖尿病者尿の両者間で最も著しい差のみられるのは Lysine, Arginine, Histidine および Threonine である。

執筆するに当り終始御懇篤なる御指導を賜つた山田弘三教授および御協力頂いた小川先生に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kotake, Y. Jr., Inada, T.: J. Biochem. 403: 291 (1953).
- 2) Kotake, Y. Jr., Inada, T., Matsumura,

- Y. : J. Biochem. 412 : 255 (1953). 3) Fowler, D.I., Norton, P.M., Cheng, M.W., Pratt E.L. : Arch. Biochem. Biophys. 68 : 452 (1957). 4) Stein, W.H., Moore, S. : J. Biol. Chem. 192 : 663 (1951). 5) Stein, W.H., Moore, S. : J. Biol. Chem. 201 : 405 (1953). 6) Decker, P. : Klin. Wschr. 29 : 418 (1951). 7) Berry, H.K., Cain, L. : Arch. Biochem. 24 : 179 (1949). 8) 三辺 : 日消化会誌, 49 : 74 (昭26). 9) 三尾 : 名古屋医学, 75 : 180 (昭33). 10) Ishihara, I., Komori, Y., Iida, H. : Nagoya J. Med. Sci., 14 : 149 (1951). 11) Awapara, J. : J. Biol. Chem. 178 : 113 (1949). 12) 佐竹 : 化学の領域, 4 : 32 (昭25). 13) 宮尾 : 臨床内科小児科, 6 : 302 (昭26). 14) 倉橋, 藺田 : 生化学, 29 : 72 (1957). 15) Pratt, J.J., Auclair, J.L. : Science 108 : 213 (1948). 16) Kelley, J.J., Waisman, H.A. : Blood J. Hematol. 12 : 635 (1957). 17) Wu, C. : J. Biol. Chem. 207 : 775 (1954). 18) Rautenburg, H.W. : Biochem. Zschr. 329 : 254 (1957). 19) Dose, K. : Biochem. Zschr. 329 : 417 (1957). 20) Wolfe, M. : Biochem. Biophys. Acta 23 : 186 (1957). 21) Dunn, M.S., Akawaie, S. Yeh, H.L., Martin, H. : J. Clin. Invest. 3 : 302 (1950). 22) Lathem, W. : Am. J. Med. 18 : 249 (1955). 23) Harrison, H.E., Harrison, H.C. : J. Amer. Med. Ass. 164 : 1571 (1957). 24) Cooper, A.M. : J. Clin. Invest. 29 : 265 (1950). 25) Stein, W.H., Bearn, A.G., Moore, S. : J. Clin. Invest. 33 : 410 (1954). 26) Bearn, A.G. : J. Clin. Invest. 33 : 400 (1954). 27) Staue, U. : Klin. Wschr. 35 : 860 (1957). 28) Nutr. Rev. 16 : 39 (1958). 29) Nutr. Rev. 13 : 266 (1955). 30) Flock, E.V., Block, M.A., Mann, F.C., Grindlay, J.H., Bollman, J.L. : J. Biol. Chem. 198 : 427 (1952). 31) Doolan, P.D., Harper, H.A., Hutchin, M.E., Shreeve, W.W. : J. Clin. Invest. 34 : 1247 (1955). 32) Bearn, A.G., Billing, B.H., Sherlock, S. : Clin. Sci. 11 : 151 (1952). Olson, R.E. : J. Amer. Med. Ass. 164 : 1758 (1957)より引用. 33) Milman, A.E., De Moor, P., Lukens, F.D.W. : Amer. J. Phys. 166 : 354 (1951). 34) Christensen, H.N., Wilber, P.B., Coyne, B.A., Fisher, J.H. : J. Clin. Invest. 34 : 86 (1955). 35) Lotspeich, W.D. : J. Biol. Chem. 186 : 461 (1959). 36) Doolan, P.D., Harper, H.A., Hutchin, M.E., Alpen, E.L. : J. Clin. Invest. 35 : 888 (1956). 37) Mellinkoff, S.M., Boyle, D., Frankland, M., Geispel, M. : Stanford M. Bull. 13 : 117 (1955). Diabetes 5 : 163 (1956)文献紹介.