シアンによる低酸素状態がマウス脳各部位の 遊離アミノ酸代謝に与える影響について

Effect of Cyanide Hypoxia on Free Amino Acid Metabolism
in Mouse Brain

大阪医科大学解剖学教室第二講座 (主任 木原 隆教授)

島 田 真 久・栗 本 圭 久・渡 辺 正 仁

大阪医科大学衛生学教室 (主任吉田寿三郎教授)

吉 田 康 久

Masahisa Shimada, Kiyohisa Kurimoto and Masahito Watanabe

Department of Anatomy, Osaka Medical College, Osaka

Yasuhisa Yoshida

Department of Hygiene, Osaka Medical College, Osaka

The effect of cyanide hypoxia on the metabolism of free amino acids in mouse brains was studied by testing the radioactive metabolites of injected $[U-^{14}C]$ glucose. Free amino acids in mouse brains were separated by a fraction collector, and analysed by gas-liquid chromatography. ^{14}C concentrations of free amino acids were estimated separately for each region of the brain with a scintillation spectrometer. Macroautoradiographs were analyzed with a microdensitometer and radioactive concentrations for each region of the brain were computed.

In hypoxic brains, each free amino acid showed a decrease of ^{14}C uptake and especially in the neo-cerebral cortex and caudate nucleus where the activity of cytochrome oxidase is always high in normal mice. However, in the thalamus, hypothalamus and medulla oblongata, it was only slightly below normal. This indicates that these regions are most resistant to cyanide poisoning. In the cerebellum, the decrease of ^{14}C uptake by each amino acid was between that in the neo-cerebral cortex and in the medulla oblongata.

These results of chemical analysis are closely comparable to those obtained by macroautoradiography. Low radioactive concentrations on the autoradiographs were noted in the neo-cerebral cortex, and relatively high concentrations in the thalamus, hypothalamus and medulla oblongata after cyanide poisoning.

1. 緒 言

中枢神経系におけるグルコースならびに遊離アミノ酸代謝に関しては、正常状態における解明のみならず、生体が異常な環境におかれた場合においても種々の角度から検討されている。しかし、これらの研究が従来主として生化学の分野から行なわれたことにも関係して、その多くは脳全体を対象としており、脳の解剖学的区分にしたがって各論的に解明した報告はまだすくないのが現状である。

従来、われわれは正常動物に放射性グルコースを投与した場合の放射性炭素 (^{14}C) の脳内分布を macroautoradiography により解剖学的脳区分にしたがって検討し、脳各部位による radioactivity の相違を明確にするとともに、paper-chromatography により脳の ^{14}C の約80%が遊離アミノ酸にとりこまれることを明らかにした¹⁾。これらの事実によりグルコース代謝と遊離アミノ酸代謝が密接な関係にあることを再確認した。また、脳を真空凍結乾燥し、各部分を分離し、gas-liquid chromatography により各部位の遊離アミノ酸構成を明らかにし、同時に

それらの脳各部位間の差異を確認した²⁾。また $[U-^{14}C]$ glucose から分離した ^{14}C の各遊離アミノ酸への 編入率を検討し脳各部位によって異なっていることを明らかにした²⁾。

一方、衛生学および産業医学の立場から検討されてきた種々の薬物中毒のうち、一酸化炭素、アニリン、シアン中毒のごとくメトヘモグロビンを形成し、さらに直接的にチトクロームオキシダーゼ活性を阻害することにより脳の低酸素状態を惹起し、しばしば致命的な転帰をとる一群の疾患がある³⁻⁵⁾。従来のこれら疾患に対する研究において脳の個々の部位における代謝異常を各論的に検討したものは比較的すくない。まして我々がさきに述べたごとく従来の研究において脳部位間における遊離アミノ酸構成の差異があること、解糖作用と極めて深い関係にある各遊離アミノ酸への ^{14}C の編入がアミノ酸の種類によってことなること、また同一アミノ酸でも部位によりその編入に差があるという証明は各部位に関しての各論的研究の必要性を示唆している。また脳の低酸素状態がグルコースおよび遊離アミノ酸代謝に対して深い影響力をもつことは従来の研究からも容易に推量される。

これらの理由により、われわれは本研究において従来おこなってきた正常動物を対象とした一連の研究成績の基盤にたつて、シアン投与により脳に低酸素状態を実験的に惹起せしめ、その場合の脳各部位におけるグルコースおよび遊離アミノ酸代謝の実態を検討することにした。この研究により将来さらに進んで脳の低酸素状態を惹起する種々の急性および慢性中毒状態の検討、さらにはそれらの予防および救急処置に対する新しい方法にむかっの足がかりが見出されることが期待される。

2. 実験方法

本実験には体重約 20g の雄或いは雌の d.d. 系成熟マウス各 6 例を使用した。 $[U-^{14}C]$ glucose (比放射能 1.5 mCi/mg) は溶液 0.1ml が 50 μ Ci になるように生理的食塩水で希釈し使用した。

2・1 シアン中毒 生理的食塩水に溶解した KCN をマウス腹腔内に注射した。KCN の半致死量 LD_{50} (5.0 mg/kg) の一回投与により動物は急激な中毒症状を呈し、興奮期、不調期、痙攣期の呼吸停止により死亡する。このため初回に半量 (2.5mg/kg) を投与し、5 分後に残り半量を追加投与し、このとき同時に $[U-^{14}C]$ glucose の投与をおこなった。注射後 5, 15, 30 分に断頭をおこない、直ちに脳を摘出、ドライアイス粉末で凍結せしめて分析試料とした。なお上述の実験過程中死亡した

ものは検索の対象から除外した。

2・2 ガスクロマトグラフィー 上述の方法により得たシアン中毒マウスを 3 群にわけ、 $[U-^{14}C]$ glucose 投与 (1.25 μ Ci/g を腹腔内注射) ののち、それぞれ 5, 15, 30 分で断頭、すみやかに脳を摘出、物質の移動および流出を防ぐため直ちに凍結し、真空凍結乾燥ののち、凍結乾燥脳を解剖学的区分にしたがって各脳部位 (大脳新皮質、尾状核、視床、視床下部、小脳半球、延髄) に分離し²⁾、同一脳部位の 2 例分をガスクロマトグラフィー (GLC) 分析の単位試料とした。各試料は秤量ののち 10 % トリクロル酢酸 (TCA) で氷冷しながらホモジナイズし、1 夜放置ののち遠心分離 (0℃にて 35,000g 10 分間)、その上澄を試験管に移し沈澱は TCA で数回洗浄、その上澄をさきの上澄に加えたものを遊離アミノ酸測定材料とした。GLC 分析のためこれを 60℃ で減圧乾固し、内部標準液としてステアリン酸メチル 2.5 μ mol 加えたのち Gehrke らの方法⁶⁾ に従いメチルエステル化とブチルエステル化を行ない、最終的には無水トリフルオロで n-ブチル-N-トリフルオロアセチルエステル化 (T-酢酸 FA 化) を行ない、濃縮したのち GLC (島津製 4A-PTF ガスクロマトグラフ) に注入した。これらの試料作製とともに分析の基準試料を得るため、アミノ酸標準液 (ミドリ十字製、各アミノ酸 2.5mol 含有) を同様に処理したのち GLC で分析し、そのクロマトグラムから各アミノ酸 (アラニン Ala, グリシン Gly, γ -アミノ酪酸 GABA, アスパラギン酸 Asp, グルタミン酸 Glu) のピーク面積の比 ($R-MR_{aa}/glu$) および内部標準物質 (i.s.) と Glu のピーク面積の比 ($RMR_{glu}/i.s.$) を求め補正のための基準とした。本研究に用いたアミノ酸量の計算式は次の通りである。

$$RMR_{glu}/i.s. = \frac{\frac{PERK \text{ AREA}(glu) \times SAMPLE \text{ W.T.}}{MOLE. WT. (CH_3-STEARATE)}}{\frac{SAMPLE \text{ WT.}}{MOLE. WT. (glu)}} \times PERK \text{ AREA (n-BUTYL STEARATE)}$$

$MOLE_{aa} = \frac{AREA_{aa} \times MOLE_{i.s.}}{AREA_{i.s.} \times RMR_{glu}/i.s. \times RMR_{aa}/glu}$
各アミノ酸ピーク面積はデジタルインテグレータ (ガスクロ工業製 MDL-301) を用いて自動的に測定した。同時に GLC カラム出口に取り付けた分取装置 (島津製 A PP-5) により分取されたおのおの一定量をシンチレータ (PPO 4g + POPOP 0.1g + Toluene 500ml + Ethyl Alcohol 500ml) をみたした分取管に誘導し、バブリング法によりトラップした。ついでこれらをシンチレーションカウンター用バイアルに移し、各アミノ酸の比放射能 (dpm/ μ mol) を液体シンチレーションスペクトロメータ

Fig. 1 GLC chromatogram and chromatographic conditions

(日立堀場製 LS-500) にて測定した (計数効率55%)。なお GLC クロマトグラムと分析条件は Fig. 1 に示した。ここで GLC クロマトグラム上において Aspartate, Glutamate¹⁾として測定されたものは、生体内においてはそれぞれアスパラギン酸+アスパラギン, グルタミン酸+グルタミンである。これはアスパラギン, グルタミンの TFA 化による誘導体がアスパラギン酸, グルタミン酸の TFA 化による誘導体とそれぞれ同一物であることによる。このことは予備実験において確かめられた。

2.3 ガスクロマトグラフィー質量分析

GLC で分離した各成分を正確に同定するためにガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) を GC-MS 分析器 (島津製 LKB-9000) を用いて行なった。分析条件は GLC の場合と同様であるが、イオン化電圧のみは 20eV である。クロマトグラムは Fig. 2 に示した。これにより GLC クロマトグラム上の a, b, c, d, e がそれぞれ Ala, Gly, GABA, Asp, Glu であることを確認した。

2.4 マクロオートラジオグラフィー

シアン中毒マウスに対する [U-¹⁴C]glucose の投与

および脳の凍結乾燥にいたるまでの全実験行程は GLC の場合と同じ方法と条件で行なった。そのうち凍結乾燥脳を真空中にてパラフィン包埋, ミクロトームで所定のレベルの切片を作製, 暗所で Medical X-ray film を用いてコンタクト法によりマクロオートラジオグラフ (MAR) を作製 (暗所温度は 5°C, 暴射期間は約14日間), MAR 上の脳各部位における黒化度をマイクロデンシトメータ (サクラ製 PDM-5) で測定した。

2.5 データの処理

各データの結果は、t-検定によって統計学的判定を, おこなった⁷⁾。

3. 実験結果

Table 1 は正常マウスとシアン中毒マウスの脳各部位における [U-¹⁴C]glucose 注射後の遊離アミノ酸の比放射能を示したものである。正常マウスにおいては脳各部位の遊離アミノ酸への ¹⁴C の取り込まれ方は時間とともに増加しているが、シアン中毒マウスでは [U-¹⁴C]glucose 注射後 5 分で視床, 視床下部の [Gly を除けば正常に

Fig. 2 The 20-eV mass spectrum of free amino acids in mouse brain

比してすべて取り込みが明らかに低く、15、30分においても Ala, Gly 以外のアミノ酸は視床下部を除くすべての部位において取り込みの減少がみられる。各アミノ酸に関しては GABA, Asp, Glu 等のグルタミン酸近縁のアミノ酸は視床下部の5、15分を除けば取り込みが低く、正常マウスに比べ平均約50~70%の低下率を示す。これに反して Ala はシアン中毒マウス5分ではすべての部位において取り込みの低下がみられるが15、30分では正常マウスのレベルに回復する。特に視床、視床下部、延髄では15分にみられるごとく取り込みは正常値をこえている。同様のことは Gly においても示されている。即ち5分においても他のアミノ酸とことなり、視床、視床下部において取り込みの低下はまったくみられず、30分における大脳新皮質、小脳半球、尾状核における取り込みは正常マウスの場合と同値を示し、視床、視床下部ではむしろ正常値をこえている。ただし延髄における Gly は例外であり、正常マウスに比し各時間とも著明な ^{14}C 取り込みの低下がみられる。

Fig. 3 はシアン中毒マウスにおいて正常マウスに比べ比放射能の有意の低下を示した遊離アミノ酸についてその低下率を脳各部位ごとに示したものである。この図よ

りシアン中毒マウスにおいては正常マウスと比較する場合、次のことが明らかにされる。

- 1) 検索の対象としたすべての遊離アミノ酸において大脳新皮質における ^{14}C の取り込みの低下は他の部位よりも極めて強い。
 - 2) Ala, Asp, Glu への ^{14}C の取り込みは尾状核において明らかに低下を示す。
 - 3) GABA に関しては延髄における取り込みの低下。
 - 4) Gly に関しては小脳半球、延髄における低下。
 - 5) Glu に関しては初期で延髄における低下が強いが GABA, Gly に比べるとその後の回復率が高い。
- またこれらと反対に ^{14}C 取り込みの低下が比較的すくないアミノ酸と脳部位に関しては、
- 6) 小脳半球における GABA, Asp, Glu。
 - 7) 視床における Glu を除く各アミノ酸。
 - 8) 視床下部におけるすべてのアミノ酸。があげられる。

Fig. 4 には正常マウスとシアン中毒マウスの各30分の MAR と各部位のデンシトグラムを示した。これにより正常マウスに比し、シアン中毒マウスでは大脳新皮質の黒化度が他部位に比し著明に下がっていることが解る。

Table 1 Specific radioactivity of free amino acids in mouse brain regions after intraperitoneal injection of [¹⁴C] glucose under normal and cyanide poisoned conditions

A. A.	Surv. Inter.	Cerebr. N.		Cerebell. H.		Nuc. Caud.		Thal.		Hypothal.		M. Oblongata	
		Normal	Cyanide	Normal	Cyanide	Normal	Cyanide	Normal	Cyanide	Normal	Cyanide	Normal	Cyanide
Ala	5	610±90	110±20	740±150	70±40	1,180±110	120±10	1,100±570	320±50	720±190	140±100	700±30	250±80
	15	1,600±310	2,030±610	1,890±250	2,160±140	2,610±560	1,560±640	920±110	3,090±920	710±40	2,670±540	850±60	1,680±750
	30	3,980±2,360	4,300±2,700	1,960±830	3,110±490	4,850±2,170	3,670±1,600	3,250±650	5,380±1,000	5,490±870	4,910±1,770	2,410±770	2,070±300
Gly	5	60±10	20±10	180±40	20±10	190±40	TRACE	240±10	200±40	70±30	30±20	100±10	TRACE
	15	480±110	160±50	380±100	170±30	470±0	200±100	120±40	80±30	440±290	80±10	100±20	30±10
	30	210±20	360±70	540±370	300±150	680±90	890±320	370±130	640±50	100±20	330±30	190±50	70±10
GABA	5	480±20	20±10	630±130	90±50	940±90	50±10	480±10	140±30	430±90	30±10	590±70	30±20
	15	2,450±20	560±270	2,690±130	1,120±110	2,450±410	440±280	2,620±30	820±220	1,460±280	480±190	2,900±400	650±380
	30	6,550±1,180	1,390±410	5,490±2,410	1,900±130	5,610±1,540	1,990±1,180	5,440±220	1,630±500	3,100±630	790±100	4,340±870	1,850±480
Asp	5	130±10	TRACE	100±30	20±10	410±30	10±0	260±90	40±20	160±90	30±20	200±80	TRACE
	15	1,310±40	190±100	660±20	200±40	1,950±120	220±100	940±20	250±140	750±70	190±90	820±40	260±50
	30	2,700±310	800±220	2,160±370	870±270	3,040±1,280	510±350	2,300±40	480±140	1,510±230	340±30	1,870±360	980±270
Glu	5	200±10	30±10	170±50	60±40	190±50	30±10	140±10	40±10	100±10	140±90	280±20	40±20
	15	1,750±30	470±230	960±40	590±210	1,690±160	450±210	1,220±40	540±300	790±50	680±310	1,850±70	630±270
	30	5,570±340	1,170±550	4,170±1,000	1,500±270	5,300±2,240	1,390±970	4,880±330	1,230±500	2,950±1,240	710±220	3,960±590	1,930±120

Specific radioactivity ; d.p.m./ μ mol $\pm$ S.D.
Three determinations from one out of two brains make up the mean values.
Cerebr. N. cerebral neocortex
Cerebell. H. cerebellar hemisphere
Nuc. Caud. nucleus caudatus
Thal. thalamus
Hypothal. hypothalamus
M. Oblongata medulla oblongata
↓ Significant decrease at $P<0.05$ as compared with the normal conditions.
↑ Significant increase at $P<0.05$ as compared with the normal conditions.

Fig. 3 Distribution map of percentage decrease (P.D.) in brain region where showed the significant decrease in specific radioactivity (S.A.) during anoxia as compared with the normal conditions

$$P.D. = \left(1 - \frac{\text{S.A. of each amino acid under cyanide poisoning}}{\text{S.A. of each amino acid under normal conditions}} \right) \times 100$$

■ 85% ≤ P.D. < 100%
 ▨ 70% ≤ P.D. < 85%
 ||| 0% < P.D. < 70%

Fig. 4 Macroautoradiogram and densitogram of mouse brain under normal and cyanide poisoned conditions

4. 考 察

シアンはチトクロームオキシダーゼの活性を阻害することにより組織内での酸素の利用を妨げる組織内低酸素の状態、いわゆる hypoxia の状態を生じさせる⁵⁾。特に脳においてはグルコースが唯一のエネルギー源であると

言われていることから⁸⁾ シアン中毒による hypoxia のため、グルコースおよびそれに由来する物質、特に遊離アミノ酸の代謝異常をきたすことは自明のことである。本実験において Table 1 に示すごとくシアン投与後15分での Ala の ¹⁴C 取り込みが正常と同程度であり、Gly を除く他のアミノ酸のごとく低下を示さないことが注目される。

かかる現象はシアン中毒による低酸素状態のため、好氣的代謝回路が障害を受け、嫌氣的条件のもとに Embden-Meyerhof の模式によるピルビン酸合成ののち、そのトランスアミナーゼにより Ala が合成されることに起因するものと思われる。このことは固体発生学的に胎児脳中に Ala が多く含有されている事実⁹⁾ や比較発生学的に低い地位にある動物(軟体動物)中に Ala が多いことと^{10, 11)} 考え合わせても肯定できる。また15分で好氣的回路の代謝率が低下していることは GABA, Asp, Glu の ¹⁴C の取り込みが正常に比し50~70%も落ちていることから推察できる。また Gly における ¹⁴C の取り込みが延髄において他の部位と比較して特に減少していることは正常の場合の含有量が延髄において他の部位より非常に高いという事実¹²⁾ と、Gly が抑制性アミノ酸である¹³⁾ という背景を考え合わせると極めて興味深い現象である。

つぎに各部位のシアン中毒による影響の差を GLC 分析成績とともに MAR の成績により検討した結果では [U-¹⁴C]glucose 投与後の時間経過による相対黒化度 (R.D.) の変化にしたがって脳部位を次の二群に大別することができる。ただし MAR の検討は全例を通じ最も黒化度が低く、かつ最も安定している脳梁を 1.0 とした脳各部の R.D. をもとめこれを基準としておこなった。

グループ1: 大脳新皮質, 尾状核

グループ2: 視床, 視床下部, 延髄

グループ1は中毒例において R.D. が著明な低下を示した部位であり、シアンに対して感受性が高いことが理解される。これらの部位はいずれもチトクロームオキシダーゼ活性が高い部位である^{14, 15)}。このことはとりまおさずチトクロームオキシダーゼ活性の高い部位において特に低酸素に対する抵抗性が弱いことを意味する。グループ2は中毒例において著明な R.D. の変化を示さない部位である。すなわちこれら部位はシアンに対する感受性の低いことが明らかである。なおこのグループに属する部位ではチトクロームオキシダーゼの活性が低いことが一般に認められている^{14, 15)}。これらのことから大脳新皮質, 尾状核では好氣的代謝が旺盛であり、視床, 視床下部, 延髄ではこれと逆に嫌氣的代謝が盛んであると言える。なおこれと関連して Dempsey, Wislocki はグルコース代謝活性の低い部位、または嫌氣的代謝の旺盛な部位にグリコーゲンの沈着が認められることを報告しているが¹⁶⁾、この場合彼等のいうグリコーゲン沈着度のたかい部位は、我々がグループ2として指摘した嫌氣的代謝の旺盛な部位と全く一致している。以上のごとくアミノ酸代謝の面から得られた我々の結果は、チトクロ-

ムオキシダーゼおよびグリコーゲンに関して得られている結果と全く一致した。なお小脳半球はいずれのグループにも属していないが、これは R.D. 変化が小脳半球においては両者の中間的な値を示すためである。このことは遊離アミノ酸の ¹⁴C 取り込みの低下がシアン中毒において比較的少ないこと、またチトクロームオキシダーゼの活性も両グループの部位の中間値をとるという事実によって証明される。これらを総合すると、視床, 視床下部, 延髄はシアン中毒に対しても強い抵抗性を示し、逆に大脳新皮質, 尾状核は抵抗性が低く、小脳半球は両者の中間値を示す。

5. 要 約

シアン中毒により惹き起こされた低酸素状態が脳各部位に与える影響を [U-¹⁴C]glucose 投与後の脳各部位について、遊離アミノ酸代謝の面より研究した。その結果脳各部位間の低酸素状態に対する抵抗性の相違が認められた。すなわち視床, 視床下部, 延髄は低酸素状態に対し比較的大きな低抗性をもつが、大脳新皮質, 尾状核は抵抗性が小さいことを見出した。しかしながら小脳半球は低酸素状態に対して中間的な抵抗性を示した。

文 献

- 1) Shimada, M. et al.: Distribution of radioactive carbon from [U-¹⁴C]-glucose in adult mice brains in vivo under normal conditions, *Acta Anat. Nippon.*, **45**, 149-157 (1970).
- 2) Shimada, M. et al.: Topographic separation of lyophilysed mouse brain and gas-liquid chromatographic analysis of free amino acids in brain divisions, *Acta Anat. Nippon.*, **47**, 138-153 (1972).
- 3) Lawrence, T. F.: *Industrial toxicology*, p.159-273, Hafner Publishing Company, New York and London (1969).
- 4) 上代皓三, 中尾喜久: 血球色素の生理と臨床, P.614-626, 医学書院, 東京・大阪 (1958).
- 5) Mcilwain, H.: *Biochemistry and the central nervous system*, p.30, J & A Churchill L. T. D., Boston (1955).
- 6) Gehrke, C. W., & Stalling, D. L.: Quantative analysis of the twenty natural protein amino acids by gas-liquid chromatography, *Separ. Science*, **2**, 101-138 (1967).
- 7) 岸根卓郎: 統計学, P.384-391, 養賢堂, 東京 (1968).

- 8) 時夷利彦：脳の生理学, P. 440, 朝倉書店, 東京 (1970).
- 9) Robertis, R. B. et al.: Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis XX 111. Further observations relating to the synthesis of amino acids and proteins by the cerebral cortex and liver of the mouse, *J. Neurochem.*, **4**, 78-90 (1959).
- 10) Bradford, H. F. et al.: Glucose and amino acid metabolism in some invertebrate nervous systems, *J. Neurochem.*, **16**, 969-978 (1969).
- 11) Cory, H.T. et al.: Glucose and amino acid metabolism in octopus optic and vertical lobes in vitro, *J. Neurochem.*, **16**, 979-988 (1969).
- 12) 栗本圭久：鯉, 蛙および鳩の脳部位のアミノ酸の定量分析に関する研究, *解剖学雑誌*, **47**, 338-356 (1972).
- 13) Levi, G. et al.: Control of cerebral metabolite levels. I. Amino acid uptake and levels in various species, *Arch. Biochem Biophys.*, **119**, 303-311 (1967).
- 14) 清水信夫：脳グリコーゲンの組織化学, *生体の化学*, **9**, 194-201 (1958).
- 15) Shimizu, N. et al.: Histochemical studies of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase of the rabbit brain, with special reference to the results in the paraventricular structures, *J. Comp. Neur.*, **108**, 1-21 (1957).
- 16) Denpsey, E. W. & Wislocki, G. B.: Observations on some histochemical reactions in the human placenta, with special reference to the significance of the lipoids, glycogen and iron, *Endocrinology*, **35**, 409-429 (1944).

(受付1973年12月21日)