

尿毒症におけるグアニジノ化合物に関する研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (主任：森 昭胤教授)

松 本 路 子

(昭和50年5月21日受稿)

I 緒 言

急性・慢性腎不全にさいしては、腎から排泄されるべき窒素化合物が体内に貯留して、血中の窒素化合物含有量が異常に上昇し、尿毒症の発生をみるが、末期には、周知のごとく消化器、循環器、呼吸器、造血管、神経系などに多彩な症状を呈するにいたる。この尿毒症の発生機序をめぐって、尿毒症患者血中に特異的に増量し、かつ生体に何らかの有害な作用をもたらすいわゆる“uremic toxin”に関する多くの研究がなされてきた。¹⁻⁷⁾すなわち、urea, uric acid, creatinine, phenolなどがそれである。その後、化学分析法の進歩にとともに、種々の血液成分の分離・定量が可能となるにおよび、尿毒症患者血液成分の分析も詳細に行なわれるようになったが、最近ではとりわけいくつかのグアニジノ化合物、なかでも guanidinosuccinic acid⁷⁻⁹⁾と methylguanidine¹⁰⁻¹²⁾が尿毒症患者血中及び尿中に増加すること、およびこれらの物質が、in vivo 及び in vitro の実験で、¹³⁻¹⁵⁾各種の酵素系あるいはその他の生理的機能を阻害することが明らかにされるに及び、尿毒症発現機序が、中枢神経系における障害もふくめて注目を集めている。

一方、森らは pentylenetetrazol 静注によるウサギの薬物痙攣時に、脳組織抽出液中には γ -guanidinobutyric acid が増加すること、又 γ -guanidinobutyric acid は正常ウサギの大槽内投与によって痙攣を誘発する作用^{16,17)}のあることを見出したことに端を発し、生体内に存在するグアニジノ化合物のうちのいくつかのものは同様な痙攣あるいは異常興奮を誘発せしめる作用があることを明らかにし、グアニジノ化合物¹⁸⁾が中枢神経系の異常興奮にさいして何らかの役割を演じていることを示唆してきた。

さて、先にわれわれは、陽イオン交換樹脂を用いた液体クロマトグラフィーによるグアニジノ化合物の自動分析装置を開発し、¹⁹⁻²¹⁾哺乳動物組織中には

未知物質も含めて、多種類のグアニジノ化合物が存在することを報告した。本報告においては、更に多種類のグアニジノ化合物を同時に測定しうるように分離定量の方法を改良し、この方法を用いて、正常人及び尿毒症患者の血清中のグアニジノ化合物を guanidinosuccinic acid, methylguanidine のみならず、種々のものについて系統的に分離定量することに成功し、尿毒症患者における血液病態像をより明確化した。ついで、臨床生化学的検索によって得られた知見を、さらに実験的に裏づけるためにウサギを用いて実験的尿毒症をつくり、尿毒症時における血清中および脳組織中のグアニジノ化合物の量的変化を詳細に検討し、ある種のグアニジノ化合物が痙攣誘発性の uremic toxin であることを実証し、これらのグアニジノ化合物が、尿毒症の中枢神経系障害の発現因子であるという可能性を示唆した。

II 実験材料及び実験方法

1) グアニジノ化合物の定量分析法

陽イオン交換樹脂を用いた液体クロマトグラフィーによる方法で、グアニジノ化合物の検出のために坂口反応を回路に組みこんだ自動分析装置 (JLC-6 UH, 日本電子株式会社) を用いた。装置に関する詳細はすでに報告した²²⁾分析試料は 0.01N HCl (pH 2.2) に溶かして用い、一回の分析に供する検体量は 0.8ml である。LCR-2 (JEOL Custom Spherical Resin, 日本電子株式会社) をつめたカラム (8 x 150 mm) を用いて、溶出液には 0.38 N クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.10) 13 ml, 0.38 N クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.26) 38 ml, 0.35 N クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.28) 76 ml, 0.35 N ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.70) 50 ml, 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液 25 ml, 0.4 N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml を順次用いた。これらの溶出液には、各々 20% Brij-35 溶液を 2 ml/l の割合で添加した。グアニジノ化合物の標準試料としては、taurocyamine, gu-

anidinosuccinic acid, glycoeyamine, N-acetyl-arginine, γ -guanidino- β -hydroxybutyric acid, β -guanidinopropionic acid, γ -guanidinobutyric acid, ϵ -guanidinocaproic acid, arginine, homo-arginine, methylguanidine を各々0.1 μ mole/mlの濃度に0.01 N HCl (pH2.2) に溶かして用いた。各グアニジノ化合物の定量は得られたチャートよりH-W法を用いて計算した。各試料の回収率は、内部標準として、 ϵ -guanidinocaproic acid を用いて計算した。

2) 試料の前処理法

血清：ヒトの正常対照群としては研究室の男女職員13名(年齢23~42才)の血清を用いた。尿毒症血清は高尿素窒素値(BUN: 40-161mg/dl)を示す腎不全患者について検査したものである。

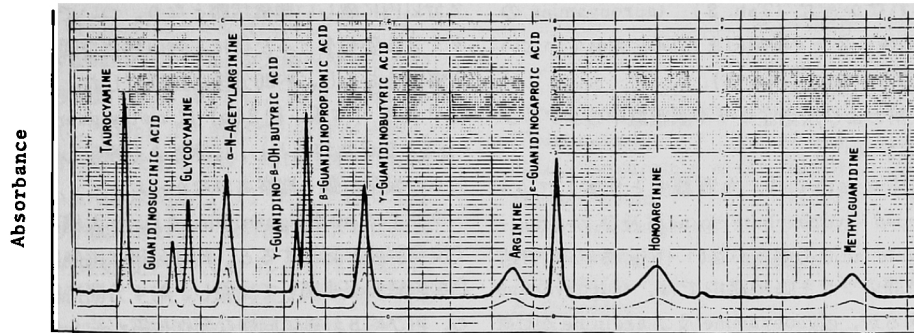
これらの試料は採血後、直ちに血清を分離し(5

~6 ml), 4-5倍容の1%ピクリン酸を加え除蛋白を行なうがそのさい前処理過程での回収率計算のために ϵ -guanidinocaproic acidを一定量加えた。低速遠沈により、蛋白を除いた上清と沈渣の洗滌液とを合せたのち、過剰のピクリン酸をDowex 1 x 8 (Cl-form) に吸着させて除き、ついで減圧乾固したものを分析用試料としたが、分析にさいしては一定容の0.01 N HCl (pH2.2) に溶かして、カラムに注入した。なお試料の保存は-20℃で行なった。これらの操作は注意深く行なえば、個々のグアニジノ化合物で多少の差はあっても、85-90%の回収率で行なうことができる。

脳組織：ウサギを無麻酔下に開頭し、直ちに小脳を含めた全脳をとり出し、液体窒素中で凍結させ、-20℃で凍結保存した。除蛋白処理は、7倍容の冷80%エタノール中でホモゲナイズして行なった。そ

Tab. 1 Guanidino compounds standard mixture

		μ mole/ml
(1) Taurocyamine	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{SO}_3\text{H}$	0.1
(2) Guanidinosuccinic acid	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	"
(3) Glycoeyamine	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	"
(4) N-acetylarginine	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\overset{\text{NHCOCH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}\cdot\text{COOH}$	"
(5) γ -Guanidino- β -hydroxybutyric acid	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	"
(6) β -Guanidinopropionic acid	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	"
(7) γ -Guanidinobutyric acid	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	"
(8) ϵ -Guanidinocaproic acid	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	"
(9) Arginine	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\cdot\text{COOH}$	"
(10) Homoarginine	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\cdot\text{COOH}$	"
(11) Methylguanidine	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}\cdot\text{CH}_3$	"

Fig. 1 Chromatographic analysis of a standard mixture of guanidino compounds(0.1 μ mole/ml).

のさい回収率による補正を行なうために一定量の ϵ -guanidinocaproic acid を加えた。低速遠沈後の上清と、沈渣の一回洗滌液とを合せて、これに等量のクロロホルムを加えて振盪後、遠沈して水層をとる。これを減圧乾固して一定容の0.01 N HCl (pH2.2) に溶かして検体とし、分析時まで -20°C で凍結保存した。操作過程での Guanidino 化合物の最終回収率は80-90%である。

3) ウサギの実験的尿毒症

2.5-3 kgの成熟ウサギを pentobarbital 麻酔下で開腹し、左右の尿管結紮術を行なった。術後48時間で無麻酔下に開頭し直ちに全脳を摘出し液体窒素中で凍結させた。

4) 脳波記録法

成熟ウサギおよびネコを用い、pentobarbital 軽麻酔下に挿管して人工呼吸を行ないながら succinylcholine で非動化した後、生理食塩水に溶かした methylguanidine の一定量 (2-10 mg) を大槽内に注入し脳波的な検討を行なった。ウサギでは頭蓋骨に打ちこんだビス電極によって皮質脳波を記録したが、ネコでは同様の方法で皮質脳波を記録した他に、定位的に刺入した双極針電極によって、大脳皮質、淡蒼球、背側海馬、扁桃核などから深部脳波の記録も行なった。

III 実験成績

1) 標準試料の溶出 pattern について。

11種類の Guanidino 化合物を含む標準試料 (Tab. 1) 0.8 ml について分析を行なった。各 Guanidino 化合物の濃度は0.1 μ mole/mlである。結果は Fig. 1 に示すように、taurocyamine, guanidinosuccinic

acid, glycoyamine, N-acetylarginine, γ -guanidino- β -hydroxybutyric acid, β -guanidinopropionic acid, γ -guanidinobutyric acid, arginine, ϵ -guanidinocaproic acid, homoarginine, methylguanidine の順に分離検出された。この記録紙に記録されたそれぞれの peak 面積を H-W 法で求め、未知の検体中のそれぞれに対応する Guanidino 化合物の peak 面積と比較計算することにより、それら検体の濃度を算出した。

2) 正常人及び尿毒症患者血清中の Guanidino 化合物について。

Fig. 2 に示すように正常人血清中では arginine が最も多く、taurocyamine, guanidinosuccinic acid 及び glycoyamine が少量存在し、その他 N-acetylarginine などの微量成分が存在する。尿毒症患者血清中の Guanidino 化合物総量は正常時のそれよりも増加する (Tab. 2)。特に taurocyamine 及び guanidinosuccinic acid の増加が著明である。14例中6例に微量の methylguanidine が検出された (Fig. 3)。taurocyamine, guanidinosuccinic acid 及び methylguanidine の量と BUN 値との間には直接的な相関関係は認められなかった。

3) 正常及び尿毒症ウサギ血清中の Guanidino 化合物について。

ウサギ血清中の Guanidino 化合物は、ヒト血清中のそれと比較すると、全体的にやや濃度が高いが各 Guanidino 化合物含有量の相対比は余りかわらない。taurocyamine の peak の前にまだ同定されていない peak がひとつ認められた (Fig. 4)。尿管結紮後48時間のウサギ血清中 (BUN: 90-219 mg/dl) の Guanidino 化合物は正常時よりも増加する。特に

taurocyamine と guanidosuccinic acid の増加が著明で、微量ではあるが全例に methylguanidine が検出された。その他のグアニジノ化合物の量的変化は認められなかった (Tab. 3)。taurocyamine の peak の前後に 2~3 種類のまだ同定されていない peak が認められた (Fig. 5)。

4) 正常および尿毒症ウサギ脳組織中のグアニジノ化合物について。

脳組織中においては、血清濃度と比較して γ -guanidino- β -hydroxybutyric acid 及び γ -guanidinobutyric acid の濃度が高い (Fig. 6)。尿管結紮後 48 時間のウサギ脳組織中では、taurocyamine は増加するが、glycocyamine 及び arginine が有意に減少し、総量も減少した。また 9 例中 5 例に methylguanidine が検出された (Fig. 7, Tab. 4)。

5) methylguanidine の痙攣誘発作用について。
methylguanidine 3 mg を 0.2 ml 水溶液として、無処置ウサギ (体重: 約 2 kg) の大槽内に投与すると、2 分以内に激しい興奮状態となり、ついでじっとうずくまる姿勢をとった後に、強直性及び間代性の全身痙攣をおこし、約 20 分後には死亡した。また無処置ウサギ (体重: 約 2 kg) に methylguanidine 45 mg を 1.5 ml 水溶液とし、耳静脈より投与した場合は何らの異常行動も観察されなかった。

ウサギに methylguanidine 4 mg を大槽内投与して皮質脳波を記録すると、約 10 分後に両側同期性の高振幅棘波が連続して出現し、約 4 分間持続したのち、再び約 8 分後に同様な発作放電が約 5 分間認められ、直後に死亡した (Fig. 8)。ついでネコに methylguanidine 8-10 mg を大槽内に注入して皮質脳

Fig. 2 Chromatographic analysis of human normal serum.

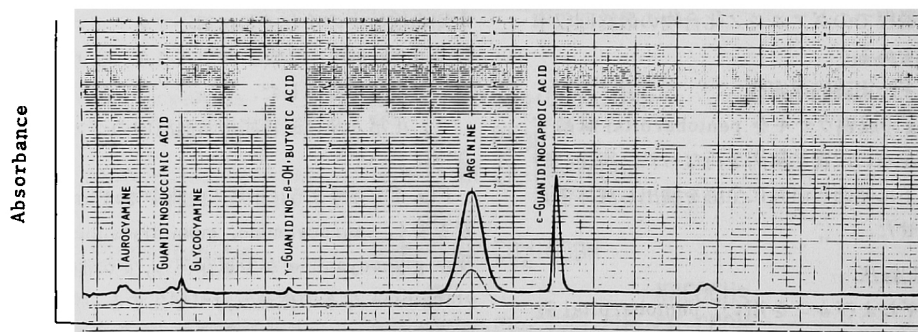
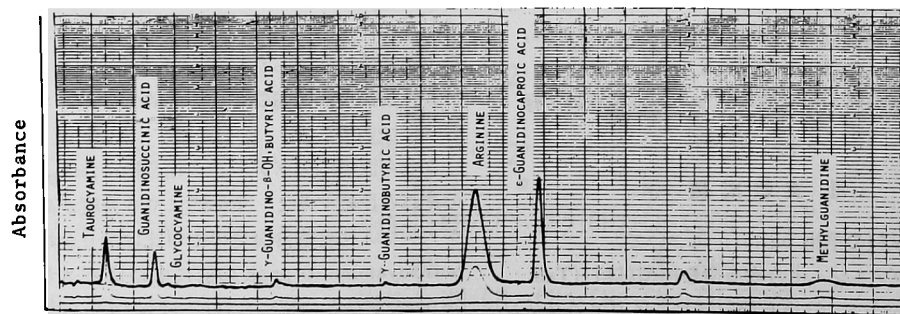


Fig. 3 Chromatographic analysis of human uremic serum.



波を記録すると15~20分の後にウサギについての場合と同様な発作放電が観察された (Fig. 9). この発作放電は3~4分間持続し, 8~10分間の間歇期をおいて約1時間にわたって反復出現した. 一方, ネコに methylguanidine 10 mg を大槽内投与したのちの深部脳波記録 (Fig. 10) では, 約5分後にまず背側海馬 (d. Hipp) より散発性の棘波が出現しはじめ, 次第に頻度を増した後, 約15分後には扁桃核 (Amy) から中脳網様体 (RF) に発作放電が拡がっていくのが観察された. 18分後にはさらに淡蒼球 (GP) から運動領皮質 (Cx) にも発作放電の伝播が認められたが, これらの部位における発作放電の出現は辺縁系のそれに比べて不十分であった. 上記の発作放電は, 10~15分の間隔をおいて反復出現した.

7) guanidinosuccinic acid のウサギ大槽内投与について.

体重2 kgの無処置のウサギに guanidinosuccinic acid 8 mg を水溶液0.4 ml として大槽内に投与したが痙攣は誘発されず異常行動も全く認められなかった.

Tab. 2 Guanidino compounds in human serum (mean \pm s. d.)

N	normal	uremia
	(n moles/ml)	(n moles/ml)
BUN (mg/dl)	13	14
	7~20	40~161
Taurocyamine	4 \pm 1	27 \pm 12 *
Guanidinosuccinic acid	7 \pm 3	79 \pm 69 *
Glycoyamine	7 \pm 3	T
α -N-Acetylarginine	T	T
γ -Guanidino- β -OH-butyric acid	T	T
β -Guanidino propionic acid	T	T
γ -Guanidinobutyric acid	ND	ND
Arginine	139 \pm 31	162 \pm 47
Homoarginine	T	T
Methylguanidine	ND	T
Total	143 \pm 39	296 \pm 101 *

*: significant difference $p < 0.001$
 ND: not detected
 T: trace

Tab. 3 Guanidino compounds in rabbit serum (mean \pm s. d.)

N	normal	uremia
	(n moles/ml)	(n moles/ml)
BUN (mg/dl)	9	10
	16~26	90~219
Taurocyamine	4 \pm 1	23 \pm 10 *
Guanidinosuccinic acid	16 \pm 9	170 \pm 60 *
Glycoyamine	14 \pm 5	19 \pm 8
α -N-Acetylarginine	ND	ND
γ -Guanidino- β -OH-butyric acid	3 \pm 1	8 \pm 4
β -Guanidino propionic acid	T	T
γ -Guanidinobutyric acid	ND	ND
Arginine	278 \pm 74	204 \pm 54
Homoarginine	ND	ND
Methylguanidine	ND	6 \pm 3
Total	314 \pm 81	450 \pm 90 **

*: significant difference $p < 0.001$
 **: significant difference $p < 0.01$
 ND: not detected T: trace

Tab. 4 Guanidino compounds in rabbit brain (mean \pm s. d.)

N	normal	uremia
	(n moles/g)	(n moles/g)
BUN (mg/dl)	9	9
	16~26	90~219
Taurocyamine	4 \pm 1	16 \pm 7 *
Guanidinosuccinic acid	23 \pm 3	18 \pm 5
Glycoyamine	10 \pm 3	2 \pm 1 *
α -N-Acetylarginine	ND	ND
γ -Guanidino- β -OH-butyric acid	49 \pm 6	48 \pm 28
β -Guanidino propionic acid	T	T
γ -Guanidinobutyric acid	16 \pm 3	14 \pm 4
Arginine	257 \pm 36	99 \pm 14 *
Homoarginine	ND	ND
Methylguanidine	ND	T
Total	359 \pm 37	199 \pm 39 *

*: significant difference $p < 0.001$
 ND: not detected
 T: trace

Fig.4 Chromatographic analysis of rabbit normal serum.

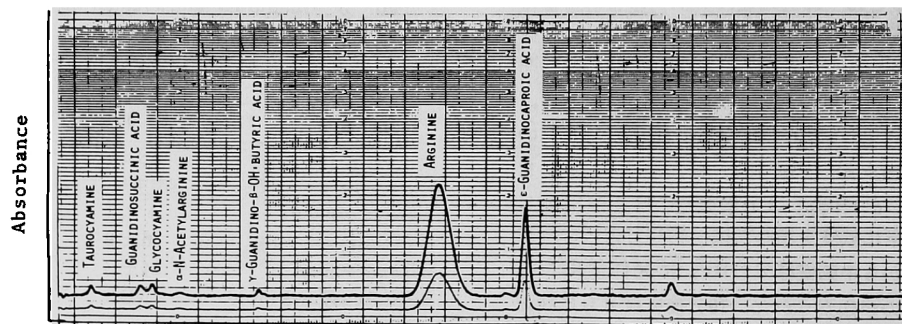


Fig.5 Chromatographic analysis of rabbit uremic serum.

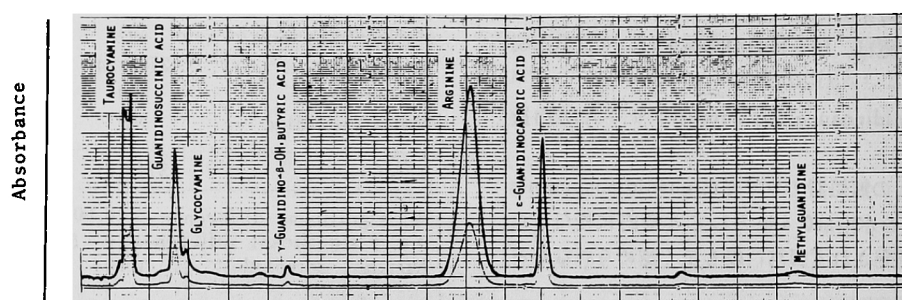


Fig.6 Chromatographic analysis of rabbit normal brain.

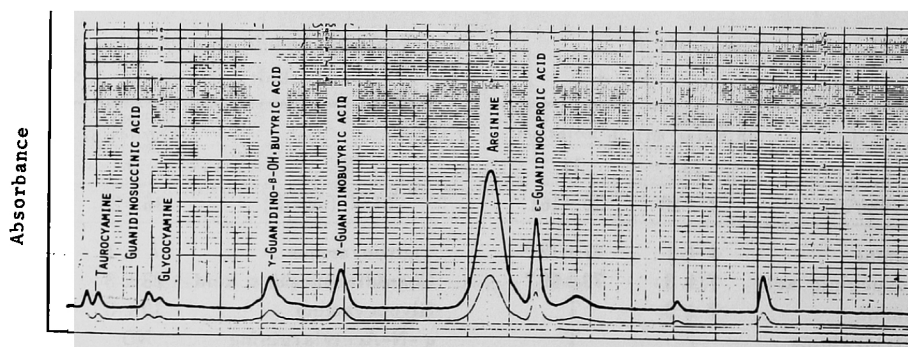


Fig.7 Chromatographic analysis of rabbit uremic brain.

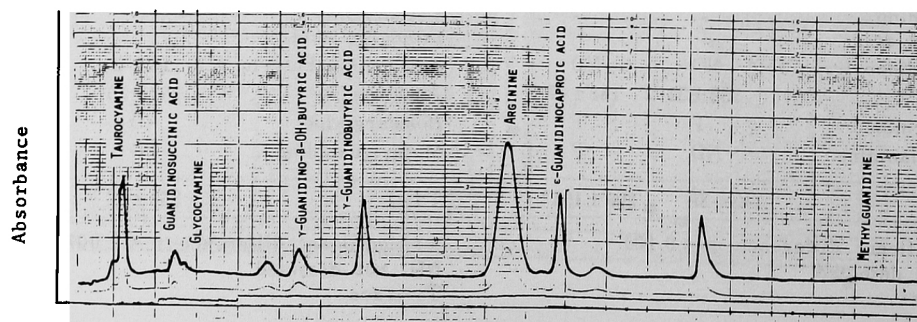


Fig.8 EEG of rabbit administered 4 mg of methylguanidine (intracisternal injection)

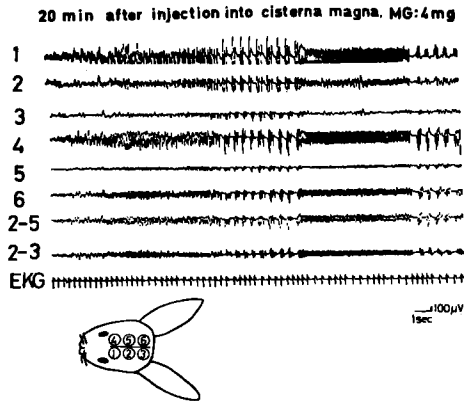


Fig.9 EEG of cat administered 8 mg of methylguanidine (intracisternal injection)

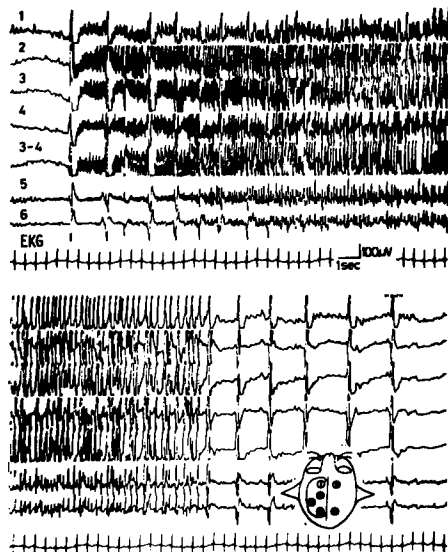
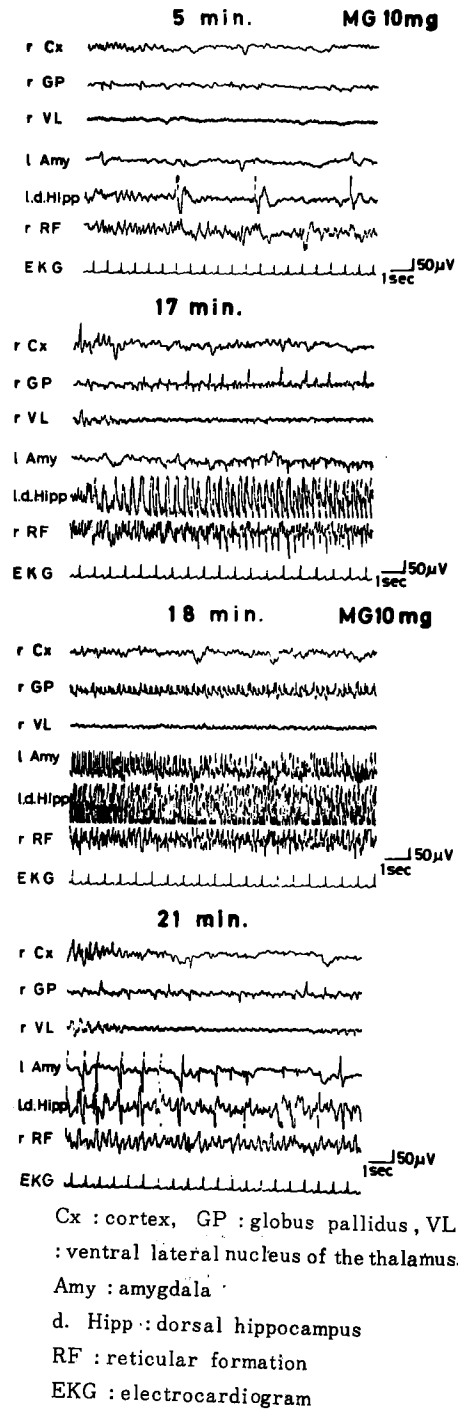


Fig.10 Depth EEG of cat after intracisternal injection with 10 mg of methylguanidine.



IV 考 按

1963年, Bonas, Cohen, Natelson は Dowex 50を用いて尿毒症患者の尿を分析し, 正常人の尿に比較して増加している坂口反応陽性物質に着目し²¹⁾, それを guanidinosuccinic acid であることを証明した²²⁾。ついで Yatzidisら²⁴⁾は1966年, 活性炭吸着法によって, 血中のグアニジノ化合物の定量を行ない, 尿毒症患者の場合にはそれが有意に増加していることを報告した。以後, 血中及び尿中の guanidinosuccinic acid と methylguanidine の定量分析に関するいくつかの報告がある。しかし, これらはいずれの場合も, イオン交換樹脂によって, まず目的のグアニジノ化合物を分離し, ついで坂口反応によって検出定量する方法が適当であるとしているが, 対象は guanidinosuccinic acid, methylguanidine および glycoyamine に限定されていて, 血中あるいは尿中に同時に存在するその他のグアニジノ化合物についてはふれていない。これらを含めて種々のグアニジノ化合物の生体内代謝経路は, 現在のところまだ完全には解明されていないが, 直接の生成過程の大部分は amidinotransferase による amidine 基転移反応によるのであろうと考えられている。従って, 種々のグアニジノ化合物の相互間には amidine 基転移を介して密接な関係があるものと考えられ, それらの代謝を考えるにあたっては, 同時に存在する全てのグアニジノ化合物を系統的に分離定量して総合的に考慮する必要がある。

先にわれわれは, 陽イオン交換樹脂を用いた液体クロマトグラフィーによる自動分析装置を開発し, それを用いて, ウサギ, マウス及びヒトの脳組織中のグアニジノ化合物の含有量を測定²³⁾したが, ここではこの方法のうち, 溶出液を一部改良し, 種々のグアニジノ化合物の分離能を改善せしめて測定可能なグアニジノ化合物の数を増やした。すなわち, 最初の緩衝液を pH3.10 にすることによって taurocyamine と glycoyamine の間に guanidinosuccinic acid を分離検出し, 回収率の計算のために用いた ϵ -guanidinocaproic acid を arginine のあとに溶出せしめるために pH6.70 の緩衝液を使った。更に methylguanidine を溶出するために, 最後に 0.4N 水酸化ナトリウム溶液を用いた。これによって11種類のグアニジノ化合物を順次溶出させ, 定量することが可能になった。なお検出感度もよく各グアニジノ化合物の検出限界は 5 nmoles/ml であった。

さて, 正常人血清中のグアニジノ化合物含有量については, さきに戴¹¹⁾の報告がある。ここで得られた成績とそれを比較すると, 戴の測定している N-acetylarginine の量が非常に高値であり, arginine よりも多い。したがって血清の前処理法及び分析条件について検討を行なったところ, 血清の前処理に酸加熱法を用いた場合でも N-acetylarginine の含有量は微量であった。戴の報告における分析条件では N-acetylarginine とみなされていた分析チャート上の peak は, 溶出液の pH を pH4.26 から pH5.28 にあげたために出現した非特異的な溶出物による peak と重なったために, 大きな peak としてチャート上に記録されたものと考えられる。

尿毒症患者血清中に guanidinosuccinic acid⁷⁻⁹⁾ 及び methylguanidine¹⁰⁻¹³⁾ が有意に増加していることは他の研究者達の報告とよく一致している。しかし尿毒症患者血清中に taurocyamine が増加していることはまったく新しい知見である。taurocyamine はメタンフェタミン中毒により異常興奮をおこしているウサギの脳組織中に増加していることや, またこれをウサギ大槽内に注入すると, 特異な強直性痙攣が誘発されることなどが知られている。したがって, グアニジノ化合物に "uremic toxin" としての可能性を考えるならば, guanidinosuccinic acid 及び methylguanidine と同様に taurocyamine についても今後その病態生理学的な面から広く検討する必要があると思われる。

尿毒症時, 血中の guanidinosuccinic acid が増加する代謝機序については, いくつかの仮説が提示されているがまだ完全には説明されていない。Cohenら¹⁴⁻¹⁸⁾は, 尿毒症患者の血中では, creatinine, glycoyamine 及び guanidinosuccinic acid は増加しているが arginine の量は変わらないこと, また尿中の排泄は glycoyamine が著減し, guanidinosuccinic acid が増加するが arginine は変わらないことから, 尿毒症時には正常時とは異なったアンモニア解毒機構が働いていることを推測し, その説明として二つの可能性を挙げている。すなわち, そのひとつは, 尿毒症時, 血中に creatinine が増加すると, arginine-glycine amidinotransferase の活性が抑制されて, それに代る経路として, arginine-aspartic acid amidinotransferase の活性が高まるために guanidinosuccinic acid が増加することであり, 他のひとつは, 尿素サイクルの中間代謝物である argininosuccinic acid を分解する argini-

nosuccinase の活性が抑制されるために、それとは別の酵素反応で argininosuccinic acid が分解されて ornithine と guanidinosuccinic acid ができるといふことである。

一方、Natelsonら^{39)~41)}はマウス、ラット、ウサギ及びヒトの肝臓、脾臓、腎臓及び胸部組織から調製した amidinotransferase について、pH や amidine 基供与体をいろいろと変えた種々の条件下で、amidine 基転移反応について検討を行なっているが、その結果として、ornithine や glycine へは amidine 基転移が行なわれるが aspartic acid 又は asparagine への反応は行なわれなかったと報告している。彼らはヒト腎臓の argininosuccinic acid lyase と同じ分画に含まれる縮合酵素により、pH 6.9、室温 40 時間の条件下で、canavanine と fumaric acid とから canavaninosuccinic acid が合成されること、またここに生じた canavaninosuccinic acid はヒト肝臓アセトンパウダーの抽出液により、嫌気的条件下で還元型 lipoic acid を水素供与体として、guanidinosuccinic acid と homoserine に分解されることを報告している。通常、健康なヒトでは腎臓の amidinotransferase 活性が高いために、canavanine は canaline と arginine あるいは glycoyammine に変えられるが、腎疾患時には腎臓の amidinotransferase 活性が低下するために canavaninosuccinic acid が生成される反応系が強められることは十分考えられる。最近の報告⁴¹⁾によると、canavaninosuccinic acid から guanidinosuccinic acid が生成されるか、あるいは canavanine を経て glycoyammine が生成されるかは、各々の反応を触媒する酵素の最適 pH に依存しており、その最適 pH はそれぞれ pH 8.7 と pH 6.4 となっている。腎疾患時の尿の pH と guanidinosuccinic acid の生成との間に関係があるかもしれない。

つぎにウサギの尿管を結紮するかわりに、腎動脈及び腎静脈を同時に結紮した実験例においても taurocyamine 及び guanidinosuccinic acid が結紮前の 8-10 倍に上昇しており、methylguanidine も検出されることが観察されたが、この事実は taurocyamine, guanidinosuccinic acid 及び methylguanidine の主な合成臓器は腎臓ではないことを示している。最近⁴²⁾血中の arginine-glycine amidinotransferase 活性は健康正常人には検出されないが、窒素排泄機能障害を伴うある種の腎疾患患者においては、著明に上昇するという興味深い報告がある。

つぎにウサギ脳組織中のグアニジノ化合物の含有量を血清中のそれと比較すると、 γ -guanidino- β -hydroxybutyric acid 及び γ -guanidinobutyric acid が脳組織に特異的に多いことが観察された。このさい、 γ -guanidinobutyric acid の多いことはその前駆物質である γ -aminobutyric acid が脳に特異的に存在することから首肯できるが、 γ -guanidino- β -hydroxybutyric acid が γ -amino- β -hydroxybutyric acid の transamidination によって生成されるとするところの前駆物質の脳組織中の含有量が非常に少ないという事実⁴³⁾と矛盾するようと思われる。また γ -guanidino- β -hydroxybutyric acid の分析チャート上に認められる peak が溶出液を切りかえたための artifact と重なっていないかという疑問も残り、更に検討する必要がある。

さて、尿毒症時に増量する脳内グアニジノ化合物の由来に関して、これらのグアニジノ化合物は血液-脳関門を通過しがたく、したがって血中から脳組織へはほとんど移行しないのでそれらの大部分は脳組織中で生成されたものと考えられる。脳組織中に amidinotransferase が存在することはすでに報告⁴⁴⁾されているが、この酵素の基質特異性は比較的 low、脳組織中の基質となるアミノ酸量の増減に対応してそれぞれ相当したグアニジノ化合物が生成されると考えられている。そのさい amidine 基受容体のうち taurine は尿毒症のさい血中に増加⁴⁵⁾したものが、比較的容易に脳内に移行するであろう。すなわち、個々のアミノ酸の血中より脳内への取り込みは、一定の他のアミノ酸によってかなり競合阻害⁴⁶⁾をうけ、例えば arginine は lysine, ornithine の量が増すと脳中への移行は阻害され、glycine は serine, threonine, alanine, asparagine, glutamine, proline などによって阻害される。けれども taurine については競り合いが認められていない。これは taurocyamine の脳内増加を説明するのに都合がよい。したがって arginine の脳組織中での減少は、血中からのとり込みの減少と taurine への amidine 基転移の亢進によるものと考えられる。methylguanidine の脳内増加についての想定される代謝経路として creatine \rightarrow methylguanidine が考えられる。このさい methylguanidine は血液-脳関門を通過しないことが知られているので、おそらくは血中に増加した creatine が脳中に移行し、methylguanidine が生成されるものと考えられる。guanidinosuccinic acid が血中には増加したが、脳内に増加しなかったことは

既述のような特異的な生成経路が脳内には存在しないためであろう。

以上, taurocyamine, guanidinosuccinic acid, methylguanidine などが尿毒症時に血中および脳に増量する機序について考察を行ってきたが, つぎにそれらの病態生理学的機序にふれてみたい。以前より, 尿毒症時にみられるいくつかの特異的な症候群は, 血中に増加する特定の物質の毒性によるものではないかとの見地から, "uremic toxin" の検索が数多くなされてきた。そのさい, uremic toxin の効果の基準の設定には種々の問題があるが, われわれは一般に, 痙攣および脳波上の異常活動を中枢神経系障害のひとつの指標として研究を行っているので, ここでも痙攣および脳波異常を中枢神経系障害の目やすとした。なお, 急性無尿症患者⁴⁾など尿毒症をきたした場合, 激しい脳波異常を示す痙攣発作のおこることは周知のところである。このような観点から, 尿毒症時に異常に増加する taurocyamine や methylguanidine によって痙攣が誘発されることは非常に興味深い。とくに methylguanidine にも痙攣誘発作用があることは新発見であり, 痙攣以外の中枢作用についても今後の検索を行いたいと考えている。他方, これまで uremic toxin のひとつと考えられていた guanidinosuccinic acid には中枢興奮または痙攣誘発作用が認められなかった。guanidinosuccinic acid は中枢神経系には作用するものではなく, 尿毒症時に特異的なアンモニア処理反応の終末産物にすぎないと考えられる。

ウサギに対する methylguanidine 大槽内投与による痙攣誘発作用の有効量は, 脳湿重量g あたりで計算すると $4 \mu\text{moles}$ となり, 尿管結紮後48時間のウサギ脳内濃度の約1000倍に相当する。しかし内因性の methylguanidine が局所的に増加するとしたら, 量的には少くとも痙攣をひき起す可能性はある。taurocyamine については海馬回などに特異的に増量し, 発作活動を始発することが知られている。

これまでにウサギ及びネコを用いた実験で γ -guanidinobutyric acid,²²⁻²⁴⁾ glycoyamine,²⁵⁾ N-acetylarginine,²⁶⁾ taurocyamine²⁷⁾ などの痙攣誘発作用が明らかにされているが, 有効量, 潜時, 痙攣の型, 深部脳波的に観察される脳内初発部位などの点で, 必ずしも同一の作用機序によるものとは考えられない。今後, methylguanidine を含めてこれらグアニジノ化合物の神経細胞に対する作用機序を検索することは, 痙攣発作機序解明のひとつの手がかりとな

るものと思われる。

V ま と め

1) 陽イオン交換樹脂 (LCR-2) を用いた液体クロマトグラフィーに坂口反応試薬系を導入してグアニジノ化合物を系統的に定量分析すべく自動分析装置を作成し, 血清および脳組織の分析を行なった。そのさい溶出液を選択することによって11種類のグアニジノ化合物を連続的に定量することが可能になった。

2) 正常なヒト血清中のグアニジノ化合物の総量は $143 \pm 39 \text{ nmoles/ml}$ で, arginine の他に少量の taurocyamine, guanidinosuccinic acid, glycoyamine などが分離定量できた。

3) 血中窒素濃度が $40-161 \text{ mg/dl}$ の尿毒症患者血清中のグアニジノ化合物の総量は $296 \pm 101 \text{ nmoles/ml}$ で正常なヒトの血清と比較すると, taurocyamine と guanidinosuccinic acid に有意な増加がみられ, また微量ながら, methylguanidine が検出された。

4) ウサギを用いた尿管結紮による実験的尿毒症動物の血清中及び脳組織中のグアニジノ化合物を定量分析した結果, 尿管結紮後48時間のウサギ血清 (BUN: $90-219 \text{ mg/dl}$) 中のグアニジノ化合物は, 正常時のそれよりも有意に増加するが, 特に taurocyamine, guanidinosuccinic acid の増加が著明で methylguanidine も微量ながら増加することを明らかにした。

5) 正常なウサギの脳組織中のグアニジノ化合物の総量は, $359 \pm 37 \text{ nmoles/g}$ で血清中に比較して γ -guanidino- β -hydroxybutyric acid 及び γ -guanidinobutyric acid の濃度が高い。尿管結紮後48時間のウサギ脳組織中のグアニジノ化合物の総量は $199 \pm 39 \text{ nmoles/g}$ で taurocyamine は増加するが glycoyamine 及び arginine は有意に減少する。また methylguanidine が微量ながら検出された。

6) 無処置のウサギ大槽内に methylguanidine 1.5 mg/kg を投与すると, 3分以内に強直性及び間代性痙攣をおこした。ウサギ及びネコを用いた methylguanidine 痙攣の脳波学的検索を行なった。

(本研究の一部は文部省科学研究費による。)

終わりにあたり, 終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森昭胤教授ならびに直接御指導御協力いただきました小林清史講師, 岸川秀実先生に, また尿毒症患者血清検査に御協力下さいました岡山日

赤病院・上原偉男先生, 岡山市民病院・浅野健夫先生, 岡山済生会病院・白方隆晴先生に深く感謝の意を捧げます。さらに実験遂行にあたりましては終始

快く御助力下さいました長田堯先生, 坪井幸枝嬢はじめ研究室の皆様にご心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Gitelman, H.J.: Uremic toxins and mineral metabolism. *Arch. Intern. Med.*, **126**: 793-799, 1970.
- 2) Horowitz, H.I.: Uremic toxins and platelet function. *Arch. Intern. Med.*, **126**: 823-826, 1970.
- 3) Kinsey, E., Smith, M., & Welt, L.G.: The red blood cell as a model for the study of uremic toxins. *Arch. Intern. Med.*, **126**: 827-830, 1970.
- 4) Balestri, P.L., Biagini, M., Pindi, R., & Giovannetti, S.: Uremic toxins. *Arch. Intern. Med.*, **126**: 843-845, 1970.
- 5) 大野丞二: いわゆる uremic toxin. 代謝, **11**: 2-10, 1974.
- 6) 上田泰, 磯田和雄, 磯西寿, 伏谷靖, 御手洗哲也, 柴崎敏昭: 腎の機能(Ⅳ) uremic toxin. 代謝, **10**: 225-238, 1973.
- 7) Dobbelsstein, H., Edel, H.H., Schmidt, M., Schubert, G., & Weinziern, M.: Guanidinbernsteinsäure und Urämie. I. Mitteilung: Klinische Untersuchungen. *Klin. Wschr.*, **49**: 348-357, 1971.
- 8) Kamoun, P.P., Pleau, J.M., & Man, N.K.: Semiautomated method for measurement of guanidinosuccinic acid in serum. *Clin.Chem.*, **18**: 355-357, 1972.
- 9) Sasaki, M., Takahara, K., & Natelson, S.: Urinary guanidinoacetate/guanidinosuccinate ratio: indicator of kidney dysfunction. *Clin.Chem.*, **19**: 315-321, 1973.
- 10) Stein, I.M., Perez, G., Johnson, R., & Cummings, N.B.: Serum levels and urinary excretion of methylguanidine in chronic renal failure. *J. Lab. Clin.Med.*, **77**: 1020-1024, 1971.
- 11) Menichini, G.C., Gonella, M., Barsotti, G., & Giovannetti, S.: Determination of methylguanidine in serum and urine from normal and uremic subjects. *Experientia*, **15**: 1157-1158, 1971.
- 12) Giovannetti, S., Biagini, M., & Cioni, L.: Evidence that methylguanidine is retained in chronic renal failure. *Experientia*, **15**: 341-342, 1968.
- 13) Baker, L.R.I., & Marshall, R.D.: A reinvestigation of methylguanidine concentrations in sera from normal and uraemic subjects. *Clin. Sci.*, **41**: 563-568, 1971.
- 14) Ingerowski, R.M., Ingerowski, G.H., & Dunn, M.J.: The effects of guanidinosuccinic acid and methylguanidine on erythrocyte cation transport. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**: 80-83, 1972.
- 15) Dobbelsstein, H., Grunst, J., Schubert, G., & Edel, H.H.: Guanidinbernsteinsäure und Urämie. II. Tierexperimentelle Befunde. *Klin. Wschr.*, **49**: 1077-1083, 1971.
- 16) Giovannetti, S., Biagini, M., Balestri, P.L., Navalesi, R., Giagnoni, P., de Matteis, A., Ferro-Milone, P., & Perfetti, C.: Uraemia-like syndrome in dogs chronically intoxicated with methylguanidine and creatinine. *Clin.Sci.*, **36**: 445-452, 1969.
- 17) Minkoff, L., Gaertner, G., Darab, M., Mercier, C., & Levin, M.: Inhibition of brain sodium-potassium ATPase in uremic rats. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**: 71-78, 1972.
- 18) Balestri, P.L., Rindi, P., Biagini, M., & Giovannetti, S.: Effects of uremic serum, urea, creatinine and methylguanidine on glucose metabolism. *Clin. Sci.*, **42**: 395-404, 1972.
- 19) Horowitz, H.I., Cohen, B.D., & Martinez, P.: Defective ADP-induced platelet factor 3

- activation in uremia. *Blood*, **30** : 331-340, 1967.
- 20) Horowitz, H. I., Stein, I. M., & Cohen, B. D.: Further studies on the platelet-inhibitory effect of guanidosuccinic acid and its role in uremic bleeding. *Amer. J. Med.*, **49** : 336-345, 1971.
 - 21) Teschan, P. E.: On the pathogenesis of uremia. *Amer. J. Med.*, **48** : 671-677, 1970.
 - 22) Giovannetti, S., Cioni, L., Balestri, P. L., & Biagini, M.: Evidence that guanidines and some related compounds cause haemodialysis in chronic uremia. *Clin. Sci.*, **34** : 141-148, 1968.
 - 23) Jinnai D., Sawai, A., & Mori, A.: γ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature*, **212** : 617, 1966.
 - 24) Jinnai, D., & Mori, A.: γ -Aminobutyric acid metabolism in seizure mechanism. *Jap. J. Brain Physiol.*, **84** : 15-22, 1967.
 - 25) Jinnai, D., Mori, A., Mukawa, J., Ohkusu, H., Hosotani, M., Mizuno, A., & Choong, T. L.: Biological and physiological studies on guanidino compounds induced convulsion. *Jap. J. Brain Physiol.*, **106** : 3668-3673, 1969.
 - 26) 森昭胤: 痙攣発現機構とアミノ酸とくに γ -グアニジノ酪酸について. 第17回日本医学総会学術講演集, **1** : 396-400, 1967.
 - 27) 大楠晴美: α -N-acetyl-L-arginine のウシ脳よりの分離およびその痙攣作用に関する研究. 阪大医誌, **21** : 49-55, 1970.
 - 28) 水野晃: Taurocyamine 痙攣に関する生理学的ならびに生化学的研究. 阪大医誌, **23** : 13-20, 1971.
 - 29) Mori, A., Hosotani, M., & Choong, T. L.: Studies on brain guanidino compounds by automatic liquid chromatography. *Biochem. Med.*, **10** : 8-14, 1974.
 - 30) 細谷光彦: 液体クロマトグラフィーによる脳グアニジノ化合物の分析に関する研究, 岡山医会誌, **85** : 363-371, 1973.
 - 31) 戴礼忠: 液体クロマト自動分析を用いた guanidino 化合物一新定量法に関する研究, 阪大医誌, **24** : 229-238, 1972.
 - 32) Bonas, J. E., Cohen, B. D., & Natelson, S.: Separation and estimation of certain guanidino compounds. Application to human urine. *Microchem. J.*, **7** : 63-77, 1963.
 - 33) Natelson, S., Stein, I., & Bonas, J. E.: Improvements in the method of separation of guanidino organic acids by column chromatography. Isolation and identification of guanidosuccinic acid from human urine. *Microchem. J.*, **8** : 371-382, 1964.
 - 34) Yatzidis, H., Oreopoulos, D., Tsaparas, N., Voudiclari, S., Stavronlaki, A., & Zestanakis, S.: Colorimetric determination of guanidines in blood. *Nature*, **212** : 1498-1499, 1966.
 - 35) 水野晃, 戴礼忠, 陣内伝之助, 森昭胤, : 脳のタウロシミンに関する研究, 神経化学 **9**, 102-105, 1970
 - 36) Stein, I. M., Cohen, B. D., & Kornhauser, R. S.: Guanidosuccinic acid in renal failure. experimental azotemia and inborn errors of the urea cycle. *New Eng. J. Med.*, **280** : 926-930, 1969.
 - 37) Cohen, B. D., & Bronx, N. Y.: Guanidosuccinic acid in uremia. *Arch. Intern. Med.*, **126**, 846-850, 1970.
 - 38) Cohen, B. D., Stein, I. M., & Bonas, J. E.: Guanidosuccinic aciduria in uremia. A possible alternate pathway for urea synthesis. *Amer. J. Med.*, **45**, 63-68, 1968.
 - 39) Takahara, K., Nakanishi, S., & Natelson, S.: Cleavage of canavaninosuccinic acid by human liver to form guanidosuccinic acid, a substance found in the urine of uremic patients. *Clin. Chem.*, **15** : 397-418, 1969.
 - 40) Takahara, K., Nakanishi, S., & Natelson, S.: Studies on the reductive cleavage of canavanine and canavaninosuccinic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **145** : 85-95, 1971.

- 41) Koller, A., Comess, J. D., & Natelson, S.: Evidence supporting a proposed mechanism explaining the inverse relationship between guanidinoacetate and guanidinosuccinate in human urine. *Clin. Chem.*, **21**: 235-242, 1975.
- 42) Horner, W. H., Chambliss, J. F., & Mahanand, D.: Serum transaminase in renal disease. *Proc. Soc. exper. Biol.*, **118**: 65-69, 1965.
- 43) Elliott, K. A. C.: Current studies on GABA and other amino acids. *Jap. J. Brain Physiol.*, **84**: 4-14, 1967.
- 44) Kita, T., & Kamiya, H.: Studies on central depressants. 4. Enzymic studies on brain transaminase and one possible metabolic pathway of 4-amino and 3-hydroxy-4-aminobutyric acid. *Chem. Pharm. Bull.*, **10**: 1065-1070, 1962.
- 45) Müting, D., & Dishuk, B. D.: Free amino acids in serum, cerebrospinal fluid, and urine in renal disease with and without uremia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**: 754-758, 1967.
- 46) Neame, K. D.: Transport, metabolism and pharmacology of amino acids in brain. *In Applied Neurochemistry*, ed. by Davison, A. N. & Bobbing, J., Blackwell, Oxford, Eng, 119-177, 1968.
- 47) Tyler, H. R.: Neurologic disorders in renal failure. *Amer. J. Med.*, **44**: 734-738, 1968.

Clinical and experimental studies on guanidino compounds in uremia

Michiko Matsumoto

Institute for Neurobiology, Okayama Univ. Medical School

(Director: Prof. Akitane Mori)

1) Eleven guanidino compounds were successively isolated and determined in uremic serum and brain by liquid chromatography using the cation-exchange resin(LCR-2, Jelco) and selecting the proper buffer system for elution.

2) The concentration of total guanidino compounds, including arginine, taurocyamine, glycoyamine, and guanidinosuccinic acid etc., was 143 ± 39 nmoles/ml in normal human serum(BUN : 7-20 mg/dl).

3) The concentration of total guanidino compounds was 296 ± 101 nmoles/ml in serum of uremic patient (BUN: 40-161mg/dl). The concentration of taurocyamine and guanidinosuccinic acid were significantly elevated and methylguanidine was detectable in uremic serum.

4) Experimental uremia was induced by bilateral ureteral ligation of rabbit. Forty-eight hours after ligation when blood urea level rose to 90-219mg/dl, the concentration of guanidino compounds, especially taurocyamine and guanidinosuccinic acid, significantly increased.

5) The concentration of total guanidino compounds in normal rabbit brain was 359 ± 37 nmoles/g and that of γ -guanidino- β -hydroxybutyric acid and γ -guanidinobutyric acid were much higher than in serum. At forty-eight hours after bilateral ureteral ligation, significant increment of taurocyamine and decrease of glycoyamine and arginine were noted. The trace amount of methylguanidine was detected.

6) Generalized tonic and clonic convulsion was observed in the rabbit three minutes after intracisternal injection of methylguanidine (1.5mg/kg b.w.). Seizure discharges were recorded on electrocorticogram of the rabbit and cat, and it was confirmed that spike activity originated in hippocampus on depth recordings.