

# 標準灌流および血流障害時のアラニンの脳代謝

岡山大学神経精神医学教室 (主任: 大月三郎教授)

鈴木 常 夫

〔昭和47年10月21日受稿〕

## 目 次

### 緒 言

### 実験方法

- 1) 実験動物および脳灌流法
- 2) 灌流装置
- 3) 人工血液組成
- 4) 脳標本および脳動静脈血試料の化学的分析,

### 測定方法

### 実験結果

- 1) 灌流脳の代謝率
- 2) 血液アラニンと脳遊離アラニンの交換
- 3) 脳内アラニンの血液アラニンに対する比較  
比放射能 (R S A)
- 4) 呼吸炭酸ガスの血液アラニンに対する比較

### 緒 言

脳にとってグルコースが主要なエネルギー源であることは周知のことであるが、アラニンも、グルタミン酸<sup>15) 25) 31)</sup>、グルタミン<sup>33)</sup>、アスパラギン酸<sup>11) 42)</sup>、ロイシン<sup>20) 40)</sup>等のアミノ酸とともに脳組織で酸化基質となり得ることが証明されている。Beloff-Chainら<sup>2)</sup>、Schepatz<sup>34)</sup>、Cory and Rose<sup>6)</sup>、Sadasivudu and Lajtha<sup>36)</sup>は、脳ホモジネート又は脳切片を用いた実験で、放射性アラニンから呼吸炭酸ガスへの放射能の移行を報告している。

アラニンの脳内濃度が胎生期には高く、成長とともに低下するとの報告もある。<sup>13) 27)</sup>

大月らは<sup>28) 29)</sup> [U-<sup>14</sup>C] グルコースを用いた脳灌流実験を行い、グルコース中間代謝産物への放射能の移行を測定して、クエン酸サイクル関連アミノ酸への放射能の移行度と灌流脳機能との相関を見出した。その際アラニンは、脳機能の低下とともに脳内濃度が増加し、その比較比放射能 (R S A) も増加する事を明らかにした。このように脳の機能に影響

### 比放射能

- 5) 脳内物質の含有量の変動
- 6) 脳内物質の<sup>14</sup>C-放射能分布
- 7) 脳内物質の比放射能

### 考 察

- 1) 灌流脳代謝率
- 2) アラニンの血液-脳間の輸送
- 3) アラニンからの炭酸ガス生成
- 4) 血流障害による脳内物質の変化
- 5) 脳内物質中の<sup>14</sup>Cの分布
- 6) 脳内アミノ酸の比放射能

### 総 括

されやすいアラニンの代謝をさらに検討するために、人工血液中にL-[U-<sup>14</sup>C] アラニンを加えて標準灌流におけるアラニンの代謝をしらべると同時に、低機能状態におけるアラニン代謝の変動をしらべるために、脳血流量を標準灌流の約1/2に低下させて脳を灌流した低機能状態を標準灌流と比較検討した。

脳灌流法は、<sup>30)</sup> 血液-脳関門を生理的状態に近い状態に保ったまま、循環系の体-脳分離が行われているために、他の臓器の代謝的影響を除外して、純粋な脳のアラニン代謝と機能との相関をしらべるのに適している。又、人工灌流血液中に添加した放射性物質の比放射能 (S A) を実験経過中つねに一定に保つことができるため、実験結果の解釈が容易である。

### 実 験 方 法

#### 1) 実験動物および手術

実験には体重2.5—4.7kg (大部分は2.5—3.5kg) の成猫12匹を使用し、血流障害実験6例、標準灌流実験6例を行った。

術前処置として sodium pentobarbitone (ネンプ

タール) 45mg/kgを腹腔内に注射して麻酔し、人工呼吸下に Geiger and Magnes<sup>9)</sup> (1947) の原法を一部改良した方法<sup>20)</sup>により、脳-体循環分離手術を行った。

## 2) 灌流装置および方法

貯血槽内で水冷された人口血液は、人工心肺用ポンプ(メラD型小流量用血液ポンプLB-914型の改良型)によって送り出され、輸血用フィルターおよび1号ガラスフィルター(細孔型150~200 $\mu$ )を通り、調圧器で任意の一定流圧とされ、恒温槽で約38 $^{\circ}$ Cに温められた後、外頰動脈カニューレより脳に入る。脳を循環した血液は Sinus Transversus に開けられたカニューレより導出され、試料に用いられて再び脳を通らない開放式脳灌流法を用いた。この間、脳血流量(日本光電製MF-2型電磁流計)、血液温度(日本光電製サーモメーター)、脳波、心電図および体側血圧を連続記録し、調圧器に連なる水銀マンローメーターで灌流圧を測定した。

## 3) 人口血液組成

表1 血液組成(1 $\ell$ 中)

ウシ赤血球	500m $\ell$
Krebs-Ringer液	350m $\ell$
低分子デキストラン	60g
1.3%重炭酸ソーダ	150m $\ell$
ウシ血清アルブミン	2000mg
シチジンモノリン酸ソーダ	80mg
グルコース	1000mg
アミノ酸(mg)	
Arg. 27.1 Gly. 18.0 His. 12.9	
Ileu. 19.8 Leu. 30.0 Lys. 57.6	
Met. 20.4 Phe. 28.8 Thr. 21.0	
Try. 9.0 Tyr. 20.0 Val. 19.2	
ビタミン	
A 1.000i. u. B <sub>1</sub> 1.0mg B <sub>2</sub> 2.0mg	
B <sub>6</sub> 0.4mg B <sub>12</sub> 4 $\times$ 10 <sup>-4</sup> mg	
C 10i. u. D 100i. u.	
ニコチン酸アミド 4.0mg	
D-パントテノール 0.1mg	

表1に示した組成の灌流人口血液3000mlにL-[U-<sup>14</sup>C]アラニン(第一化学製)50 $\mu$ Cを20mg/ $\ell$ のL-アラニンとともに加えた。

森光<sup>21)</sup>が低分子デキストラン(平均分子量40,000)を使用することにより、又必須アミノ酸混合液を加えることによって脳機能を良好により長時間維持することを報告した。本実験でも、この低分子デキストランを用い必須アミノ酸を加えた。又、シチジンモノリン酸の添加により脳機能をよりよく保ち得るこ

とが Geiger and Yamasaki<sup>20)</sup>大月ら<sup>21)</sup>によって報告されており本実験でもこれを加えた。

さらに、血液中にチロシンを欠ぐ脳灌流では、灌流1時間以上で脳遊離チロシンが著明に減少することが認められている<sup>22)</sup>ので、チロシン20.0mg/ $\ell$ を加えた。

## 4) 血流障害の実験

灌流開始後約20分に、脳波を指標とした灌流脳機能<sup>23)</sup>が高機能又は中等機能を経過することを確認した上で、灌流圧を低下させることによって脳血流量を92-136ml/100g brain/min. のレベルから43.0-60.3%急速に低下させ、さらに約40分間灌流を続けた。この間、脳血流量の低下により脳液はすみやかに平坦化し低機能状態になった。

## 5) 脳標本および脳動静脈血試料の化学的分析、測定方法

灌流開始後約70分で、脳を摘出し直ちにドライアイスアセトンで凍結固定し、皮質のみを化学的分析に用いた。脳動静脈血試料は灌流開始後20, 40, 55分に同時に採取した。

### I) 血液中酸素および炭酸ガス含有量の測定

Instrumentation Laboratory製113-S2型PH/ガスアナライザーによりpO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pHを測定し、あらかじめ Natelson 微量ガス分析法<sup>24)</sup>により得られた含有量との相関曲線より含有量を求めた。

### II) 脳グルコースの測定

Somogi法<sup>25)</sup>による除蛋白液をDowex50 $\times$ 4H<sup>+</sup>型カラムを通し、その水溶出液をDowex2 $\times$ 8OH<sup>-</sup>型カラムに添加し、その水溶出分画をグルコース分画として Saifer and Gerstenfeld の Glucose Oxidase法<sup>26)</sup>により測定し、放射能の測定にも用いた。

### III) 乳酸の測定

血液および脳ともに5% TCA (trichloroacetic acid) 除蛋白液を用い、Barker and Summerson法<sup>27)</sup>により定量した。脳の乳酸の放射能測定は、5% TCA上清のDowex50 $\times$ 4H<sup>+</sup>型カラムによる水溶出液を、Dowex1 $\times$ 8酢酸型カラムを通し、水溶出分画を除去した後、2N酢酸による溶出分画を乳酸分画として用いた。

### iv) 遊離アミノ酸の分離、定量および放射能測定

脳および血清の5% TCA上清をDowex50 $\times$ 4H<sup>+</sup>型カラムにより、水による溶出液(中酸性分画)と、4Nアンモニア水による溶出液(アミノ酸分画)とに分け、後者を減圧乾燥を3回繰り返してアンモニ

アを除いた後、1N-NaOHでpH7.2-7.5に調整し、0.04ml/g brainの0.5M亜硫酸ナトリウム溶液を加えて4時間放置した後乾燥させた。これをpH2.2クエン酸緩衝液にとかして、柳本LC-4型アミノ酸自動分析装置を用いてAmberlite CG-120 0.9×100cm型カラムによりPH2.86, 0.3Nクエン酸リチウム緩衝液で分離定量した(Bensonの変法<sup>3)</sup>)。GABAはAmberlite CG120 0.9×30cm型カラムによりPH4.15, 0.5Nクエン酸リチウム緩衝液で分離定量した。

放射能測定は、アミノ酸自動分析装置のカラム溶出直後を島津製フローディテクターに連結し測定、internal standardizationにより補正した。

v) グルコース、乳酸および呼吸炭酸ガスの放射能測定

グルコースおよび乳酸の放射能は、各試料0.5mlに、トルエン・エタノール(7:3v/v)1ℓ中に2,5-diphenyloxazole(PPO)

4g, 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazole)-benzene(dimethylPPO)100gを含む溶液を加え、Packard liquid scintillation spectrometerで測定した。

呼吸炭酸ガスの放射能は、Conway容器内で炭酸ガスを遊離させて、1Mハイアミンのメタノール溶液を滲ませた濾紙片に吸着させた後、前記の方法で測定した。

各試料の放射能は、external standardizationによって補正し、disintegration per minute (dpm)として表わした。脳内グルコース中間代謝物質の比較比放射能、relative specific activity (RSA)は次の式により計算した。

$$RSA = \frac{\text{dpm}/\mu\text{mole C of Metabolite in Brain}}{\text{dpm}/\mu\text{mole C of Blood Alanine}} \times 100$$

### 実験結果

#### 1) 灌流脳の代謝率(表2)

[U-<sup>14</sup>C]グルコースを用いた灌流実験<sup>23)</sup>で、血流障害時、脳の酸素消費量、炭酸ガス生成量、グルコース摂取量が減少し、乳酸生成量が増加すること

が示された。が、本実験でも、酸素消費量および炭酸ガス生成量は、標準灌流のそれぞれ $2.09 \pm 0.61 \mu\text{mole/g brain/min.}$ ,  $1.74 \pm 0.40 \mu\text{mole/g brain/min.}$ に対して、血流障害実験では $0.83 \pm 0.18 \mu\text{mole/g brain/min.}$ ,  $0.91 \pm 0.15 \mu\text{mole/g brain/min.}$ と低下していた( $P < 0.01$ )。グルコース摂取量も標準灌流実験の $0.68 \pm 0.14 \mu\text{mole/g brain/min.}$ に対して血流障害実験では $0.32 \pm 0.23 \mu\text{mole/g brain/min.}$ と低下していた( $P < 0.1$ )。一方乳酸生成量

表2 灌流脳の代謝率

	標準灌流(6例)	血流障害(6例)
酸素消費量	$2.09 \pm 0.61$	$0.83 \pm 0.18$
炭酸ガス排出量	$1.74 \pm 0.40$	$0.91 \pm 0.15$
グルコース摂取量	$0.68 \pm 0.14$	$0.32 \pm 0.23$
乳酸生成量	$0.46 \pm 0.16$	$0.55 \pm 0.40$
$\mu\text{mole/g brain/min.}$		

表3 血液アラニンと脳アラニンの交換

	標準灌流(6例)	血流障害(6例)
動脈血アラニン量( $\mu\text{mole/ml}$ )	$0.354 \pm 0.049$	$0.346 \pm 0.031$
静脈血アラニン量( $\mu\text{mole/ml}$ )	$0.378 \pm 0.096$	$0.371 \pm 0.061$
動脈血アラニンの放射能(dpm/ml): A	$53220 \pm 13409$	$56900 \pm 4836$
静脈血アラニンの放射能(dpm/ml): V	$46329 \pm 8464$	$43210 \pm 5952$
V/A × 100 (%)	87.1	75.9
動脈血アラニンの脳へのInflux	$0.125 \pm 0.067$	
脳内アラニンの静脈血へのEfflux	$0.159 \pm 0.105$	
$\mu\text{mole/g brain/min.}$		

は標準灌流実験は $0.46 \pm 0.16 \mu\text{mole/g brain/min.}$ であるが、血流障害実験は $0.55 \pm 0.40 \mu\text{mole/g brain/min.}$ で有意差を認めなかった( $P > 0.6$ )

2) 血液アラニンと脳遊離アラニンの交換(表3) 灌流開始40分後の、脳動静脈血中のアラニン濃度は、標準灌流実験では動脈血 $0.354 \pm 0.049 \mu\text{mole/ml}$ , 静脈血 $0.378 \pm 0.096 \mu\text{mole/ml}$ で、血流障害実験では動脈血 $0.346 \pm 0.031 \mu\text{mole/ml}$ で静脈血 $0.371 \pm 0.061 \mu\text{mole/ml}$ であり、両実験ともに動静脈血中のアラニン濃度には有意差を認めなかった。

しかし、脳動静脈血中のアラニンの放射能は、標準灌流実験では動脈血 $53220 \pm 13409 \text{dpm/ml}$ , 静脈血

46329±8464 dpm/ml で、血流障害実験では動脈血 56900±4836dpm/ml、静脈血43210±5952dpm/ml であった。血流障害実験では、静脈血中のアラニンの放射能が動脈血中の放射能より有意に低下し (P < 0.005)、標準灌流でも有意差はないが低下傾向を示し、静脈血中アラニンの放射能は動脈血中アラニンの放射能の標準灌流では87.1%、血流障害実験では75.9%であった。

このことから、アラニンは血液-脳間で交換が行われることが明らかになった。

さらに、三宮<sup>35)</sup>が [U-<sup>14</sup>C] チロシンを用いた実験で行ったと同様の方法で次の式を設定し、灌流70分の時点での脳から静脈血へのアラニンの真の排出量 (Efflux : E) と、動脈血アラニンの脳への真の移行量 (Influx : I) を計算した。ここで脳内アラニンは一定値を保つものと仮定した。

$$A - aI + bE = V \quad I = E + d$$

E : 脳から静脈血へのアラニンの排出量 (μmole/g brain/min.)

I : 動脈血アラニンの脳への移行量 (μmole/g brain/min.)

d : アラニンの動静脈差 (μmole/ml)

A : 動脈血中アラニンの放射能 (dpm/ml)

V : 静脈血中アラニンの放射能 (dpm/ml)

a : 動脈血中アラニンの比放射能 (dpm/μmole)

b : 脳遊離アラニンの比放射能 (dpm/μmole)

標準灌流実験の場合、動脈血アラニンの脳への移行量は0.125±0.067 μmole/g brain/min. で、脳から血液へのアラニンの排出量は0.159±0.105 μmole/g brain./min. で両者には有意の差が認められなかった。

3) 脳内アラニンの血液アラニンに対する比較比放射能 (RSA) (表4)

表4 脳内アラニンの血液アラニンに対する比較比放射能 (RSA)

標準灌流 (6例)	血流障害 (6例)
5.90±1.80	3.80±1.10

$$RSA = \frac{\text{dpm}/\mu\text{mole of Brain Alanine}}{\text{dpm}/\mu\text{mole of Plasma Alanine}} \times 100(\%)$$

脳内アラニンの血液アラニンに依存する割合を知るために、血液アラニンの比放射能 (SA : dpm/μmole) に対する脳遊離アラニンの SA の割合を%で表わした。

標準灌流の RSA は5.90±1.80% であるのに対し、血流障害実験の RSA は3.80±1.10% であり、後者

が有意に低下していた (P < 0.02)。この値は [U-<sup>14</sup>C] グルタミン酸を脳に灌流した実験<sup>35)</sup> における灌流 60-90分でのグルタミン酸の RSA 0.58±0.089% の10-8倍であるが、[U-<sup>14</sup>C] チロシンを脳に灌流した実験<sup>35)</sup> におけるチロシンの RSA 52.0% よりははるかに低い値である。

4) 呼吸炭酸ガスの血液アラニンに対する比較比放射能 (表5)

表5 呼吸炭酸ガスの血液アラニンに対する比較比放射能 (RSA)

標準灌流 (6例)	血流障害 (6例)
0.42±0.08	0.33±0.09

$$RSA = \frac{\text{dpm}/\mu\text{mole of Respiratory CO}_2}{\text{dpm}/\mu\text{mole of Plasma Alanine}} \times 100(\%)$$

呼吸炭酸ガスの血液アラニンに由来する割合を、血液アラニンの SA に対する RSA であらわした。標準灌流実験の炭酸ガスの RSA は0.42±0.08%、血流障害実験のそれは0.33±0.09% で、血流障害実験で減少傾向を認めたが推計学上有意差はなかった。

表6 各物質の脳内含有量

	標準灌流 (6例)	血流障害 (6例)
Glutamate	9.40±0.70	9.71±1.91
Asparate	1.60±0.22	1.55±0.44
Glutamine	3.33±1.01	3.76±1.30
GABA	1.38±0.32	1.54±0.37
Alanine	0.43±0.15	0.98±0.31
Glucose	2.66±1.54	1.52±1.22
Lactate	6.05±1.53	15.89±2.72
μmole/g brain		

5) 脳内物質の含有量の変動 (表6)

脳内物質の含有量を標準灌流実験と血流障害実験について比較すると、乳酸が標準灌流実験の6.05±1.53 μmole/g brain に対して、15.89±2.72 μmole/g brain と著明に増加しており、[U-<sup>14</sup>C] グルコースを用いた血流障害実験<sup>31, 41)</sup> と同一の結果であった。グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミンおよび GABA 濃度には有意差が認められなかった。アラニンは標準灌流実験の0.43±0.15 μmole/g brain に対して、血流障害実験では0.98±0.31 μmole/g brain と有意に増加していた (P < 0.005)。

6) 脳内物質の<sup>14</sup>C放射能分布 (表7)表7 脳内物質中の<sup>14</sup>C分布

	標準灌流	血流障害
Glutamate	23.2 ± 5.3	14.9 ± 5.1
Asparate	5.0 ± 1.0	4.0 ± 2.2
Glutamine	4.6 ± 2.0	3.2 ± 1.8
GABA	2.6 ± 1.1	2.7 ± 1.6
Alanine	50.1 ± 14.9	49.3 ± 21.7
Lactate	10.2 ± 2.2	20.2 ± 5.0
	95.7	94.3
	100	100

$$RSA = \frac{\text{dpm in Each metaboelite of g Brain}}{\text{dqm in TCASupernatant of g Brain}} \times 100(\%)$$

血液 [U-<sup>14</sup>C] アラニンから脳に侵入した<sup>14</sup>C放射能の脳内各物質への分布を、脳酸可溶性分画の放射能に対する百分率としてあらわした。グルタミン酸の占める割合は、標準灌流実験では23.2 ± 5.3%であるが、血流障害実験では14.9 ± 5.1%と有意に減少していた (P < 0.1)。アスパラギン酸およびグルタミンは標準灌流の5.0 ± 1.0%, 4.6 ± 2.0%に対して、血流障害実験では4.0 ± 2.2%, 3.2 ± 1.8%と減少傾向を示したが、有意差は認めなかった。

GABAの占める割合は標準灌流実験2.6 ± 1.1%, 血流障害実験2.7 ± 1.6%と殆んど同じ値を示した。乳酸は標準灌流実験では10.2 ± 2.2%であるが、血流障害実験では20.2 ± 5.0%と血流障害実験で著明に増加していた。

アラニンへの<sup>14</sup>Cの分布は、標準灌流実験、血流障害実験ともに約50%で、[J-<sup>14</sup>C] チロシンを用いた実験<sup>25)</sup>におけるチロシンへの分布88%と比較すると、かなり低い値を示した。

## 7) 脳内物質の比放射能 (SA) (表8)

脳遊離アミノ酸、乳酸および呼吸炭酸ガスのSAをdpm/μmoleであらわし、標準灌流実験と血流障害実験とを比較した。グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミンは標準灌流実験の289.1 ± 125.3dpm/μmole, 413.3 ± 100.6dpm/μmole, 212.6 ± 134.9dpm/μmoleに対して、血流障害実験では222.5 ± 92.5dpm/μmole, 337.6 ± 93.6dpm/μmole, 127.6 ± 71.4dpm/μmoleといずれも減少傾向を示したが推計学上有意差は認められなかった。

GABAは標準灌流実験の238.3 ± 63.9dpm/μmole

表8 脳内物質の比放射能 (SA)

	標準灌流	血流障害
Glutamate	289.3 ± 125.3	222.5 ± 92.5
Asparate	413.3 ± 100.6	337.6 ± 93.7
Glutamine	212.6 ± 134.9	127.7 ± 71.4
GABA	238.3 ± 63.9	269.7 ± 113.8
Alanine	11977.1 ± 3584.0	7754.6 ± 2060.7
Lactate	220.7 ± 43.0	181.0 ± 47.0
Respiratory CO <sub>2</sub>	247.7 ± 91.7	330.8 ± 98.5
	13592 ± 4380	16032 ± 8905
	dpm/μmole	

に対して、血流障害実験では269.7 ± 113.8dpm/μmolと増加傾向を示したが有意差は認められなかった。

これらの傾向は、[U-<sup>14</sup>C] グルコースで脳を灌流した血流障害実験<sup>26)</sup>の際の脳内物質のSAの変化傾向と一致していた。

## 考 察

## 1) 灌流脳代謝率

光信<sup>26)</sup>は、[U-<sup>14</sup>C] グルコースを用いて脳灌流法による血流障害実験を行い、血流量の低下率が40%以上の際に脳の酸素消費量、炭酸ガス生成量およびグルコース摂取量がおおきく低下するが、乳酸排出量には一定の傾向を認めないと述べている。本実験の血流低下率は43.0-60.3%で全例40%以上であり、酸素消費量、炭酸ガス生成量、グルコース摂取量ともにおおきく低下し(表2)、[U-<sup>14</sup>C] グルコースを用いた血流障害実験と同一の結果であった。

## 2) アラニンの血液-脳間の輸送

グルコースが血中濃度が常に脳内濃度よりも高い「下り坂輸送」であるのに対し、多くのアミノ酸は脳内濃度が血中濃度よりも高くその輸送は濃度勾配に逆らって起る能動輸送「上り坂輸送」である。さらに脳へのアミノ酸の上り坂輸送には、脳内アミノ酸濃度の平衡を保つために規制があり、その規制はNa<sup>+</sup>との共輸送<sup>14)</sup>すなわちアミノ酸とNa<sup>+</sup>とが共通の担体に結合した形をつくり、これがNa<sup>+</sup>の濃度勾配に逆って脳内に入ることによると考えられている。

これまで種々のアミノ酸の血液-脳間の輸送についての報告は多く、グルタミン酸<sup>25)</sup>、リジン<sup>17)</sup>、ロイシン<sup>19)</sup>、プロリン<sup>7)</sup>は脳へのとり込みが強く規制されており、血液中のアミノ酸濃度をあげても脳内濃度

の上昇がみられないが、チロシン<sup>4)</sup>、<sup>35)</sup>グルタミン<sup>3)</sup>、フェニールアラニン<sup>32)</sup>は比較的脳へのとりこみの規制が少いことが知られている。脳灌流法を用いた実験<sup>35)</sup>でもチロシンについて同様の結果が得られている。

さらに、脳内アミノ酸濃度の平衡を保つためには、脳へのとり込みと脳からの排泄のほぼ等しい交換が行われている。近年アイソトープで標識したリジン<sup>16)</sup>、ロイシン<sup>19)</sup>、グルタミン酸<sup>18)</sup>を用いた実験で、これらのアミノ酸が血液-脳間でかなりすみやかに交換されることが証明された。脳灌流法を用いた実験でもグルタミン酸<sup>25)</sup>、チロシン<sup>35)</sup>について同様の結果を得ている。

L-[U-<sup>14</sup>C] アラニンを人工血液中に加えて灌流した本実験においては、標準灌流実験、血流障害実験ともに動脈血中のアラニン濃度に有意差が認められないのに、静脈血中のアラニンの放射能が、動脈血中のアラニンの放射能のそれぞれ87.1%、75.9%と下まわっていた。このことはアラニンの血液-脳間での交換が行われたことを示す。

さらに、灌流開始70分の時点の、アラニンの脳へのInflux、脳からのEffluxを計算して0.125±0.069 μmole/gbrain/min., 0.159±0.105 μmole/gbrain/min. の値を得た。この値はチロシン<sup>35)</sup>のその約3倍で、グルタミン酸<sup>25)</sup>のその約10倍高く、アラニンは脳では交換率の高いアミノ酸であると云える。

### 3) アラニンからの炭酸ガス生成

近年、アイソトープ技術の導入により、脳で生成される呼吸炭酸ガスのかなりの量がグルコース以外の物質に由来することが明らかとなり、その一部はロイシン<sup>40)</sup>、アスパラギン酸<sup>11)</sup>、グルタミン酸<sup>25)</sup>、チロシン<sup>35)</sup>等の血液中のアミノ酸からも由来することが脳灌流法を用いて証明されている。

さらに、脳内にとり込まれたアラニンも脳組織によって酸化されて炭酸ガスを生成することがBeloff-Chainら<sup>2)</sup>、Schepatz<sup>34)</sup>、Cory and Rose<sup>6)</sup>、Sadasivudu and Lajtha<sup>36)</sup>らによって報告された。

Beloff-Chainら<sup>2)</sup>はねずみの脳切片を用いた実験で、アラニンからの炭酸ガス生成はグルコースからのその約1/2であったとのべ、Schepatzは<sup>34)</sup>脳ホモジネートを用いた実験で放射能の5.32%を、Sadasivudu and Lajtha<sup>36)</sup>はねずみの脳切片を用いて約5.4%を炭酸ガスに認めたと報告し、Cory and Rose<sup>6)</sup>はねずみ脳切片におけるアラニンからの炭酸ガス生成はグルコースからのその約1/2以下であることを見出

した。本実験の標準灌流実験の際のアラニンのRSAは0.42%と前記の報告よりもかなり低い値を示している。これは血液-脳関門が保たれている脳灌流実験と前記の実験との実験方法の相違によるものと考えられる。

それにしても、L-[U-<sup>14</sup>C]ロイシン<sup>40)</sup>、L-[U-<sup>14</sup>C]アスパラギン酸<sup>11)</sup>、L-[U-<sup>14</sup>C]グルタミン酸<sup>25)</sup>を用いた灌流実験の脳から排出される呼吸炭酸ガスのRSA約1%よりも低く、脳の酸化基質としての血液アラニン依存度は、前記アミノ酸よりも低いと考えられる。

### 4) 血流障害による脳内物質の変動

[U-<sup>14</sup>C]グルコースを用いた血流障害実験で、血流障害による低機能状態の際に乳酸量が著明に増加し、クエン酸サイクル関連アミノ酸量も増加するを示すことが報告された<sup>23)</sup>、<sup>41)</sup>が、本実験でも血流障害の際に乳酸量が著明に増加し、グルタミン酸、アスパラギン酸、GABAも増加傾向を示して、[U-<sup>14</sup>C]グルコースを用いた実験と同一の結果を得た。

しかし、[U-<sup>14</sup>C]グルコースを用いた血流障害実験の際には脳内アラニン量の増加を認めなかったのに反し、本実験では血流障害の際にアラニン量が標準灌流実験よりも有意に増加した。灌流血液中にアラニンを添加しなかった[U-<sup>14</sup>C]グルコースを用いた実験と異なり、灌流血液中にアラニンを加えた本実験の血流障害によるアラニン量の増加は、添加したアラニンの酸化的代謝が障害されたためであることはグルタミン酸等クエン酸サイクル関連アミノ酸のSAの低下を認めたことから明らかである。さらにこの際、アラニンのSAの増加を認めなかったのは血液から輸送されたアラニンが代謝されないままに残る量が増大する一方、他物質からのアラニン生成も又増大したためと考えられる。

### 5) 脳内物質中の<sup>14</sup>Cの分布

血液から脳にとり込まれた[U-<sup>14</sup>C]アラニンは、アミノ基転位反応によってピルビン酸となり、酸化的脱炭酸によってAcetyl CoAとなる経路と、炭酸固定による経路によってクエン酸サイクルに入って代謝されることが知られている。

灌流開始70分後の脳内アラニンの<sup>14</sup>C放射能の脳酸可溶性分画の放射能に対する割合は標準灌流実験、血流障害実験ともに約50%であった。

Sadasivudu and Lajtha<sup>36)</sup>はマウスの脳切片をアイソトープで標識したアラニン、ロイシン、バリン、アルギニン等で2時間培養した後、脳切片のアルコ

ール抽出液の全放射能の約8%をアラニンが占めており、アラニンの代謝速度が高度であるとのべている。本実験の値も [U-<sup>14</sup>C] チロシンを用いた灌流実験<sup>35)</sup>におけるチロシンへの<sup>14</sup>C放射能の分布88%と比較するとかなり低く、アラニンの代謝速度の高いことを示している。

[U-<sup>14</sup>C] グルコースを用いた灌流実験<sup>23)</sup>、<sup>41)</sup>で、血流障害の際に脳グルコースの酸化過程に障害が起り乳酸へのグルコース炭素の流入が増加すると同時に、グルコース以外の内在基質からの流入も増加することが示された。L-[U-<sup>14</sup>C] アラニンを用いた本実験の血流障害の際のグルタミン酸への<sup>14</sup>C放射能の分布は標準灌流実験と比較して低く、アスパラギン酸、グルタミンも有意ではないが同様に減少傾向を示し、アラニンの酸化も血流障害による低機能状態の際に障害されることが明らかになった。一方、乳酸への<sup>14</sup>C放射能の分布は10.2%→20.2%と著明に増加し、アラニンから乳酸への流入が増加する事が明らかになった。このことから、[U-<sup>14</sup>C] グルコースを用いた血流障害実験の際に乳酸への流入の増加した内在基質の一部はアラニンであると考えられる。

肝臓ではアラニンからのグルコース合成が行われ、饑餓やグルカゴン、エピネフリン等の薬物投与の際にはかなり活潑に行われるとの報告<sup>8)</sup>、<sup>21)</sup>があるが、脳においてもアラニンからのグルコース合成が行われるかどうか本実験では明らかにできなかったが、例え行なわれているとしても極くわずかな量だと考えられる。

#### 6) 脳内アミノ酸の比放射能 (S A)

血流障害実験の際に、脳内グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミンのS Aは、その脳内含有量が増加傾向を示したのと反対に、標準灌流実験のS Aよりも減少傾向を示した。このことは[U-<sup>14</sup>C] グルコースを用いた血流障害実験の際のグルコースと同様に、アラニンもピルビン酸となり酸化的脱炭酸を経てクエン酸サイクルに入って代謝される過程でグルコース以外の内在性基質により稀釈されたことを意味している。

GABAのS Aは[U-<sup>14</sup>C] グルコースを用いた実験と同じく、血流障害実験で増加傾向を示し前駆物質であるグルタミン酸のS Aよりも高い値を示していた。低機能状態でGABAの量が増加するという報告<sup>43)</sup>、<sup>44)</sup>や、GABA shuntにもコンパートメンテーションを認める報告<sup>12)</sup>がある一方、血流障害の際

際には静脈血のpCO<sub>2</sub>が高くなっているため脳内のpCO<sub>2</sub>も高く、炭酸固定が増加するために、GABAのS Aがグルタミン酸のS Aより大きくなる事も考えられ、この点に関しては今後の検討を必要とする。

[U-<sup>14</sup>C] グルタミン酸を用いた灌流実験<sup>25)</sup>の際にみられたグルタミン酸-グルタミンのコンパートメンテーションの現象はアラニンでは認められなかった。

## 総 括

Geigerらの原法に一部改良を加えた脳灌流法を用いて、人工血液中にL-[U-<sup>14</sup>C] アラニンを加えて脳を灌流し、灌流圧を人為的に低下させることによって血流障害を得、その際のアラニンの代謝を標準灌流実験の際の代謝と比較検討し、次の結果を得た。

1) 血流量を43.0—60.3%低下させた血流障害実験では、標準灌流実験より酸素消費量、炭酸ガス生成量、グルコース摂取量が著明に増加し、乳酸排出量の増加を認めた。

2) 脳動静脈血中のアラニン濃度には有意差を認めないにもかかわらず、静脈血中アラニン比放射能の動脈血中アラニン比放射能よりの有意な減少を認めた。このことよりアラニンは、血液-脳間で交換が行われることが明らかになった。また、脳内アラニンの比較比放射能は標準灌流実験5.90±1.80%、血流障害実験で3.80±1.10%であった。

3) 血液中アラニンの約0.42—0.33%が脳にとりこまれて炭酸ガスにまで完全酸化され、標準灌流実験、血流障害実験で有意差を認めなかった。

4) 血流障害実験の際、脳内の乳酸量の著明な増加とアラニン量の増加傾向を認めた。

5) 標準灌流実験、血流障害実験ともに、灌流70分に脳内にとりこまれたアラニンからの<sup>14</sup>C放射能の50%がアラニンに分布していた。又、血流障害の際、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミンへの<sup>14</sup>C放射能の分布が減少し、乳酸への分布率が増加した。

6) 血流障害実験では標準灌流実験よりグルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、アラニンおよび乳酸の比放射能が減少傾向を示した。脳内GABAの比放射能は増加し、グルタミン酸の比放射能を上まわり、アラニンでもグルコースと同様に、グルタミン酸-GABAコンパートメンテーションの現象がみられた。

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った大月三郎教授に謹んで感謝の意を表します。また、終始御指導頂いた渡辺昌祐講師、実験に御協力下さった帆秋、二宮、光信、中島、三宮医学博士、

河野、江原、井口、田口医学士、実験施設を提供して下さい下さった伊原重彦慈恵病院精神医学研究所長に心からお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Barker, S. B. and Summerson, W. H. : The calorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* **138** : 535-554, 1941
- 2) Beloff-Chain, A., Masi, I., Cantazero, R., Chain, E. B. and Pocchiari, F. : The influence of glucose on acetate, alanine and pyruvate metabolism in rat cerebral cortical slice. *Proc. R. Soc.* **156** : 168-171, 1962
- 3) Benson, J. V. Jr., Gordon, M. J. and Patterson, J. A. : Accelerated chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids containing glutamine and asparagine. *Analyt. Biochem.* **18** : 228-240, 1967
- 4) Chirigos, M. A., Greengard, P. and Udenfriend, S. : Uptake of Tyrosine by rat brain in vivo. *J. Biol. Chem.* **235** : 2075-2079, 1960
- 5) Cremer, J. E. : Amino acid metabolism in rat brain studied with <sup>14</sup>C-labelled glucose. *J. Neurochem.* **11** : 165-185, 1964
- 6) Cory, H. T. and Rose, S. P. R. : Alanine metabolism in rat cortex in vivo. *J. Neurochem.* **17** : 1477-1484, 1970
- 7) Digman, W. and Sporn, M. B. : The penetration of proline and proline derivatives into brain. *J. Neurochem.* **4** : 148-153, 1959
- 8) Felig, P., Pozefsky, T., Marliss, E., Cahill, G. F. : Alanine : Key Role in Gluconeogenesis. *Science.* **167** : 1003-1004, 1970
- 9) Geiger, A. and Magnes, J. : The isolation of cerebral circulation and the perfusion of the brain in the living cat. *Amer. J. Physiol.* **149** : 517-537, 1947
- 10) Geiger, A. and Yamasaki, S. : Cytidine and Uridine requirement of the brain. *J. Neurochem.* **1** : 93-100, 1956
- 11) Gombos, G., Geiger, A. and Otsuki, S. : The metabolic pattern of the brain in brain perfusion experiments in vivo—II pyruvate and lactate formation from <sup>14</sup>C-labelled aspartate. *J. Neurochem.* **10** : 405-413, 1963
- 12) Gaitonde, M. K., Dahl, D. R. and Elliot, K. A. C. : Entry of glucose carbon into amino acids of rat brain and liver after injection of uniformly <sup>14</sup>C-labelled glucose. *Biochem. J.*, **94** : 345-352, 1965
- 13) 深井延浩：脳のアミノ酸について (X) 成熟ヒト脳およびヒト胎児脳各部位における遊離アミノ酸およびその関連物質について。岡山医学会誌 **71** : 3187-3191, 1959
- 14) 星猛：動物細胞における糖と Na<sup>+</sup>の共輸送：蛋白核酸酵素。 **16** : 735-744, 1971
- 15) Krebs, H. A. : Metabolism of amino acids; determination of amino acids. *Biochem. J.* **29** : 1620-1644, 1935
- 16) Lajtha, A., Furst, S., Gernstein, A. and Waelsch, H. : Amino acid and protein metabolism of the brain—I Turnover of free and protein bound lysine in brain and other organs. *J. Neurochem.* **2** : 209-215, 1958
- 17) Lajtha, A. : Amino acid and protein metabolism of brain II uptake of L-lysine by brain and other organ of the mouse at different ages. *J. Neurochem.* **2** : 209-215, 1958
- 18) Lajtha, A., Berl, S. and Waelsch, H. : Amino acid and protein metabolism of the brain IV The metabolism of glutamic acid. *J. Neurochem.* **3** : 322-332, 1959



- 19) Lajtha, A. and Toth, J. : The brain barrier system II Uptake and transport of amino acids by the brain. *J. Neurochem.* **8** : 216-225, 1961
- 20) Lajtha, A. : Amino acid and protein metabolism of the brain V Turnover of leucine in mouse tissue. *J. Neurochem.* **3** : 358-365, 1959
- 21) Mallette, L. E., Exton, J. H. and Park, C. R. : Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **244** : 5713-5723, 1969
- 22) 森光淳介 : ネコ脳灌流法における血液組成と脳機能 第1編 : 低分子デキストランによる脳灌流. *精神誌*. **70** : 330-342, 1968
- 23) 光信克甫 : 脳灌流法による脳血流障害の研究 第2編 : [U-<sup>14</sup>C]グルコースを用いた血流障害時の脳代謝, *岡山医会誌*. **3, 4** : 435-444, 1967
- 24) Natelson, S. : Routine use of ultramicro-method in clinical laboratory. *Amer. J. Clin. Path.* **21** : 1153-1172, 1951
- 25) 中島良彦 : 脳のグルタミン酸代謝——ネコ脳灌流法による——, *神経化学*. **6** : 11-20, 1967
- 26) 二宮淳明 : 灌流ネコ脳における [U-<sup>14</sup>C] グルコースの代謝——機能との相関——*神経化学*. **7** : 65-72, 1968
- 27) 野口鉄也, 野村正彦, 塚田裕三 : 周産期脳内物質の変動. *神経化学*. **6 Suppl.** : 90-93, 1967
- 28) 大月三郎, 山田高春, 引地明義, 修多羅正道, 森光淳介, 中島良彦 : シチデンモノリン酸, ウリジンモノリン酸の脳機能障害に対する効果, *脳と神経*. **17** : 635-640, 1965
- 29) Otsuki, S., Watanabe, S., Ninomiya, K., Hoaki, T. and Okumura N. : Correlation between [U-<sup>14</sup>C] glucose metabolism and function in perfused cat brain. *J. Neurochem.* **15** : 859-865, 1969
- 30) 大月三郎, 渡辺昌祐 : 脳灌流法——その特長と限界——*神経化学*. **8** : 3-9, 1969
- 31) Quastel, J. H. and Wheatley, A. H. M. : Oxidation of the brain. *Biochem. J.* **26** : 725-744, 1932
- 32) Roberts, R. B., Flexner, J. B. and Flexner, L. B. : Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis — XX III 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
- 33) Schwerin, P., Bessman, S. P. and Waelsch, H. : The uptake of glutamic acid and glutamine by brain and other tissues of the rat and mouse. *J. Biol. Chem.* **184** : 37-44, 1950
- 34) Schepartz, B. : Oxidation of L-amino acids and incorporation into protein in homogenates of brain at two stages of development. *J. Neurochem.* **10** : 825-829, 1963
- 35) 三宮崇典 : [U-<sup>14</sup>C]チロシンを用いた灌流ネコ脳における高フェニールアラニン血症の研究. *神経化学*. **8** : 111-117, 1969
- 36) Sadasivudu, B. and Lajtha, A. : Metabolism of amino acids in incubated slices of mouse brain. *J. Biochem.* **17** : 1299-1311, 1970
- 37) Somogi, M. : Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.* **160** : 69-73, 1945
- 38) Saifer, A. and Gerstenfelds, S. : The photometric microdetermination of blood glucose with glucose oxidase, *J. Lab. Clin. Med.* **51** : 448-460, 1958
- 39) Tallan, H. H., Moore, S. and Stein, W. H. : Studies on the free amino acids and related compounds in tissue of the cat. *J. Biol. Chem.* **211** : 927-939, 1954
- 40) 渡辺昌祐 : Infusion Method による脳アミノ酸, 蛋白代謝の研究. *神経研究の進歩*. **10** : 9-17, 1966
- 41) Watanabe, S., Otsuki, S., Mitsunobu, K., Sannomiya, T. and Okumura, N. : [U-<sup>14</sup>C] glucose metabolism of the perfused cat brain with blood flow disturbances. *J. Neurochem.* **17** : 1571-1577, 1970
- 42) Woodman, R. J. and McIlwain, H. : Glutamic acid, other amino acid and related compounds as substrates for cerebral tissue: Their effects on tissue phosphates. *Biochem. J.* **81** : 83-93, 1961
- 43) Wood, J. D. : A possible role for gamma butyric acid in the homeostatic control of brain metabolism under conditions of hyp-

- oxia. *Exp. Brain Res.* **4** : 81-84, 1967
- 44) Wood, J.D., Watson, W.J. and Ducker, A. J. : The effect of hypoxia on brain gamma-amino-butyric acid metabolism, *J. Neurochem.* **15** : 603-608, 1968

Alanine Metabolism of the Brain in Standard Brain Perfusion  
and in Blood Flow Disturbances

Tsuneo SUZUKI

Department of Neuro-Psychiatry, Okayama University Medical School

Okayama, Japan

(Director : Prof. Saburo Otsuki)

ABSTRACT

By means of the brain perfusion slightly modified of the method by Geiger artificial blood with L-[U-<sup>14</sup>C]-alanine was perfused and circulatory disturbances was induced by such artificial decrease of brain blood flow. In this instance, alanine metabolism in the brain was compared with the metabolism observable during the standard brain perfusion. The results are briefly summarized as follows.

1) In the blood flow disturbing experiments where the blood flow was lowered by 43.0-60.0% oxygen consumption, carbon dioxide formation and glucose uptake were markedly decreased, while the output of lactic acid from the brain was increased as compared with respective values in standard brain perfusion.

2) Despite the fact that there was no significant difference in the alanine concentration between the arterial and venous blood, there could be observed a significant decrease in the radioactivity of the venous blood when compared with that of arterial blood. This indicates clearly that alanine is being exchanged between the blood and brain. In addition, it has been demonstrated that the radioactivity of blood in the blood flow disturbing experiments was  $3.8 \pm 1.10\%$  as against  $5.90 \pm 1.80\%$  in the experiments of standard brain perfusion.

3) About 0.42-0.33% alanine in the blood was taken up and it was oxidized completely to carbon dioxide by the brain, showing no significant difference between the standard perfusion and blood flow disturbing experiment.

4) In the case of blood flow disturbing experiments there were observed a marked increase of lactic acid and an increasing tendency of alanine in the brain.

5) In both the standard brain perfusion and blood flow disturbing experiment alanine taken up by the brain within 70 minutes contained 50% of <sup>14</sup>C in the brain. In the latter experiments the rate of <sup>14</sup>C-incorporation into glutamic acid, aspartic acid and glutamine was decreased and its incorporation into lactic acid was increased.

6) In the blood flow disturbing experiment radioactivity in glutamic acid, aspartic acid, glutamine, alanine and lactic acid in the brain tended to decrease. The radioactivity of GABA was greater than that of glutamic acid, there could be observed a glutamic acid-GABA compartmentation phenomenon. just as in the experiments with [U-<sup>14</sup>C] glucose in the perfused blood.