

脳 の シ ス タ チ オ ニ ン

第 I 編

L-シ ス タ チ オ ニ ン の 脳 内 侵 入

岡山大学医学部神経精神医学教室（主任：奥村二吉教授）

松 田 清

〔昭和 36 年 2 月 24 日受稿〕

摘 要

生体内に於けるメチオニンからシステインへの移行経路にシスタチオニンが介在する事は1942年 du Vigneaud¹⁾ 等がこれを人工合成し、その後多くの実験を行なつて実証した。これについては Bach²⁾ の総説に詳しいが、1957年、Tallan, Moore 及び Stein³⁾ がヒトの脳内に選択的多量にシスタチオニンの存在する事を報告する迄、生理的条件において生体にこの中間代謝物は発見されてはいない。Tallan 等は、これがヒト及び猿の脳内に比較的大量存在するのに他の動物では殆んど認め得ない事を報告し、この含硫アミノ酸と高等動物の中樞神経機能との関連性について示唆を投げかけたのである。その後奥村等⁴⁾ も人脳の遊離アミノ酸を分離定量した際、この Tallan 等の報告を再確認した。元来 Gaitonde 及び Richter⁵⁾ の実験、奥村等⁶⁾ の実験によれば、メチオニンからシステインへの移行は脳でも行なわれている事はたしかであり、この際もシスタチオニンを経て代謝が進む事は当然考えられ、事実、渡辺⁷⁾、森定⁸⁾ はシスタチオニンがネズミの脳で合成分解される事を知った。それでは肝では遊離アミノ酸として取り出し得なかつたシスタチオニンが脳でかくも大量に見出されるのは何故か、又、それが人脳及び猿に限られるのは何故か。森定はこれを脳シスタチオナーゼ活性の微弱なる事で説明したが、それならばネズミその他でも見出されるはずである。森定⁸⁾ はヒトでも、癌その他器質性の疾患に際して、殊に脳内にシスタチオニンの増量を来す傾向のある事を指摘した。Greenstein¹⁰⁾ は肝腫瘍の際デスルフラゼが腫瘍組織から消失している事を報じたが、同じ意味でシスタチオナーゼも弱化しているとすれば脳腫瘍等ではシスタチオニンの貯溜も起り得よう。

しかし脳以外、例えば胃癌等で同様にして生じたシスタチオニンが脳に侵入する可能性があるであろうか。これを明らかにするには二つの疑問を解かねばならぬ。即ち、シスタチオニンが血液脳関門を通過するか否か、更に癌組織（又は脳以外のどこの組織にでも）に生じたシスタチオニンが肝の旺盛な分解を逃れて脳に入る程の能動的取り入れが行なわれているかどうかを知る必要がある。又代謝学的な問題を離れて、目的論的にシスタチオニンが生理機能的に必要なために貯溜していると考えた時にも、それ故に余計能動的に取り入れられるかも知れない、といえる。

筆者はシスタチオニンの脳内存在意義を研討するに当り、以上の理由から先づこの含硫アミノ酸の脳内侵入の有無をしらべて見た次第である。

実 験

I. 実験実験材料及び手技

用いた L-シスタチオニンは、吉富製薬より提供されたもので、フェノールアンモニア水溶液で一次元ペーパークロマトグラフィーに展開し、Rf 0.44 にニンヒドリン呈色反応で単一スポットを見出すものである。この L-シスタチオニンは水に難溶性であり 100 mg を溶解するには蒸留水 500 cc を要する。動物実験に際して注射液量の多すぎる事は希ましくないから、Tabachnik¹¹⁾ らの例にならい、これを 0.5N 塩酸で 200 mg を 10 cc に溶解し、注射直前これを 1N 苛性ソーダを適量加えて中和した。in vitro の実験でも必要濃度に応じて、適当に塩酸と苛性ソーダを用いて同様に溶解した。使用動物は、マウスは岡山大学医学部附属癌研究所のマウスコロニーで飼育した Ob 系成熟雄で体重 25~30 g のもの、ih vitro 実験に使用したラットは雑系成熟雄体

重 100 g 前後のもので、共に断頭前まで自由に飼料及び水を与えた。飼料はオリエンタル酵母工業株式会社製の固形飼料である。マウスを Cb 系に限定したのは、例えば R Ⅲ系マウスの成熟雌マウスはその80%に乳癌を発するという特異性があり、この際は緒言において述べた如く、癌という条件が脳内シスタチオニンの存在を来す可能性も考えられ、本実験に不適である。そのため、個体差の少ない Cb 系の雄に限定したわけである。

In vivo 実験では溶解したシスタチオンinをマウス体重 kg 当り 500 mg 相当 (液量 0.25 cc/10 g) 皮下注射する。別に対照として、シスタチオンin溶解に要したと略々同量の塩酸及び苛性ソーダを含む同量の中性液を同数のマウスに注射する。これを注射後 5 分, 15 分, 30 分, 3 時間, 及び 6 時間にそれぞれ心臓穿刺で採血後直ちに断頭し、延髄以上の脳及び肝を剔出した。血液は、その 0.5 cc を同量の蒸溜水を加えて溶血した後これにエタノール 3 cc を加えて振盪後遠沈し除蛋白した。この上清を蒸発乾固した後再び蒸溜水に溶解し、エーテルを加えて振盪し、蛋白及び塩類を完全に除くようにした。エーテル部分を除いてから全量を 51 番東洋濾紙につけて二次元ペーパークロマトグラムに展開する。脳及び肝はそれぞれ湿重量に対し 9 倍の 75% エタノールを加えてホモジネートにする。(氷冷操作, 約 2500 ppm 3 分間)。これを振盪後遠沈後上清 0.5 cc (組織 50 mg 相当) を血液同様、濾紙につけた。

次に、in vitro での active transport 実験ではラッテ脳切片を用いたが、切片は断頭直後剔出した大脳の皮質を氷冷 Krebs-Ringer-Phosphate (以下 K. R. P. と略称) (pH 7.2) 中で安全カミソリの刃で 0.3 mm 以下の厚さに切つて作製した。この切片に L-シスタチオンin溶液を加えてその取り込みを見るのであるが、反応容器としてワールブルグ検圧用罫子容器を用いた。容器内の構成は次の如くである。

主室: 脳切片 100 mg 前後を K. R. P. (pH 7.2) 0.8 cc に浮遊せしめる。或いはこれに 100 mg% のブドウ糖を加える。

側室: pH 7.2 に調整した 5 mM L-シスタチオンin溶液 0.2 cc

副室: 4N NaOH 0.2 cc

K. R. P. は Krebs-Ringer 液の 109 cc に 1/10 M, pH 7.4 Phosphate Buffer 14 cc を加えて pH 7.2 とする。シスタチオンin溶液は前述の如くして作る

が、対照として同量の NaOH, HCl を含む液を同量側室に入れる事は当然である。このように準備した容器に酸素を充満して後、37°C 60 分間インクベートした。インクベート後切片を取り出して濾紙を用いて組織外部に附着しているメジウムを除いてから秤量し、これを in vivo 実験の際と同様の手技を用いてアルコール 10 倍ホモジネートとし、抽出液 0.5 cc を二次元用濾紙につけた。

以上の標本を附着した濾紙は、75% フェノール水及び 4 : 1 : 1 のブタノール酢酸水の両溶媒により二次元展開を行なう。展開後の濾紙は熱風乾燥して充分溶媒を除去してから 0.2% ニンヒドリンエタノール溶液に dip し、次いでこれを風乾後 65°C に 40 分間置きアミノ酸のニンヒドリン発色を完全ならしめる。濾紙上のシスタチオンinスポットを切り出し、70% のエタノール 8 cc 中に入れ、60 分間暗所に置き発した色をアルコール中に抽出せしめ、これをコールマンジュニア比色計で比色定量する。この際、シスタチオンinスポットは、同一の標本について、塩化白金酸塩によりこのスポットが含硫アミノ酸に間違いのない事、更に溶解 L-シスタチオンin液を同時に原点に附着して展開した際スポットが単一である事を確かめる等定性的にも正確を期した。又定量には、必ず毎回、同一条件で 5~25 γ の数段階量の L-シスタチオンin溶液を展開して標準線を作り、実験誤差を最少限にとどめるようにした。以上の操作については Awapara¹²⁾, 塚田¹³⁾ らの報告を参考とした。

II. 実験成績

無処置マウス及び、対照用水溶液を注射した Cb 系成熟雄マウスでは各組織にシスタチオンinを見出し得なかつた。濾紙上に肉眼的にニンヒドリン発色を見ず、又念のため、相当する Rf 位置を切り出して見たが Back ground 以上の比色値を得なかつた。これに対して 50 mg/kg の L-シスタチオンinを投与した場合は表 1 に見る如くそれぞれ組織内に侵入

表 1. 組織中シスタチオンin量の時間的变化

| 時 間 | 脳 内 量 (mg/100 g) | 肝 内 量 (mg/100 g) | 血 中 量 (全血) (mg/100 cc) |
|------|---------------------|---------------------|---------------------------|
| 5 分 | 3.0 | 42.0 | 3.0 |
| 15 分 | 3.2 | 38.0 | 1.0 |
| 30 分 | 3.2 | 12.8 | 0 |
| 60 分 | 3.2 | 3.2 | 0 |
| 3 時間 | 2.8 | 8.0 | 0 |
| 6 時間 | 2.4 | 3.0 | 0 |

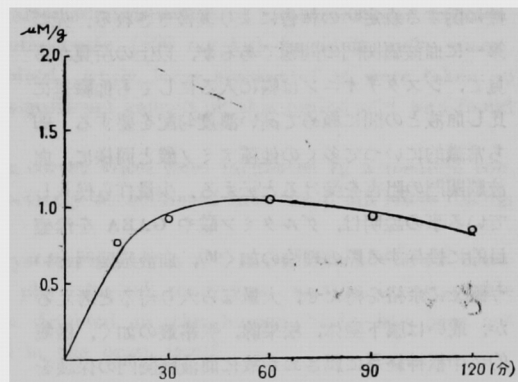
を認めた。表に明らかであるが、投与したシスタチオニンは5分後既に肝に大量が取り入れられ、それは時間と共に急速に減少している。血中濃度も時間と共に減少し30分後にはもはや認められなくなる。これは du Vigneaud 一派のいう如く、シスタチオニンの代謝が主として肝で行なわれると考えれば、体液中に移ったシスタチオニンは直ちに肝に取り入れられ、ここで分解されるのであろうから当然の現象である。

一方脳においても肝に比し極めて低いながらも少なくとも定量可能なシスタチオニンの存在を認めた。これが血中濃度、及び肝中濃度の速やかな減少に比し、安定した値を長時間保っている事は、一応血液脳関門を通過したシスタチオニンが、脳の分解能が弱いため、そのままとどまっている事を示し、脳を灌流する血液中のものが誤つて測定されたものでない事を示す。しかし、その値は極めて低く、肝に比して血液との濃度勾配が極めて高い点を考慮する必要があるが、これについては後述する。なお30分以上経過したものでは肝抽出液に、シスタチオニンのスポットに隣接してフェノール水溶媒で Rf のやや大きいスポットを見た。これは塩化白金酸塩法で含硫アミノ酸である事を知つたが、正確な同定を得られなかつた。恐らくシスタチオニン代謝系路中の中間物質の一つであろう。又、Hope¹⁴⁾ はビタミン B₆ 欠乏ネズミの脳にシスタチオニンの生成を認めたと報じているが、その際肝にはシスタチオニンと同一スポットの他物質があるため定性、定量共不能であ

ると述べているが、われわれの実験では無処置マウスにこのようなスポットを見ず、又シスタチオニン投与の例では時間と共に相当するスポットが消失して行く点で、これをシスタチオニンと認めてよいと考える。

次に in vitro での active transport 実験では先ず前述の条件で、30分、60分、90分、120分で、インクベートを中断したものについて切片内シスタチオニン量を測定して見た。図に見る如く、30分でも

図 I 脳切片シスタチオニン量の時間的变化



はや侵入は頂点に達し、それ以後は殆んど変化を見ない。又、60分を過ぎた組織は膨化して既に破壊が起つている事が明らかであつた。

そこで一応60分間インクベートしたものについてそれぞれ定量した。結果は表2に示す。表中の切片メジウム比とは、切片内のシスタチオニン量をメジ

表 2. 脳 切 片 シ ス タ チ オ ニ ン 蓄 積

| メ ジ ウ ム 条 件 | 切片内シスタチオニン (μM/g) | 切片/メジウム比 |
|---------------|-------------------|----------|
| 無 基 質 | 0 | 0 |
| シ ス タ チ オ ニ ン | 1.09±0.51 | 1.09 |
| ブ ド ウ 糖 | 0 | 0 |
| ブドウ糖+シスタチオニン | 1.01±0.35 | 1.01 |

ウム内のそれで除したものであるから、これが1.0以上の場合は、脳組織へシスタチオニンが能動的に取り入れられた事になる。本実験では前述の如く用いたメジウム内には5mMのシスタチオニン溶液0.2ccが含まれる、即ち1μMであるからこのRatioは表の如く1.09となり、先ず能動的取り入れは行なわれなかつたと見てよい。又、力源としてブドウ糖を与えたものでも同様の値を示し、何ら影響されない事を示す。次に脳切片に代えて、肝切片を用い同

様に60分間インクベートした場合は、切片内に0~0.24 μM/gのシスタチオニンを認めるのみであつたが、同時にこの際はメジウムには殆んどシスタチオニンの残留を認めず、シスタチオニンが能動的に肝切片に取り入れられ、次々に分解した事がわかつた。

Ⅲ. 考 按

以上の実験から見ると第一に、生体に大量のシスタチオニンが投与された際は、僅かながら脳にもそ

れが侵入する様であるが、それは血中に高濃度存在する間、即ち他の臓器に取り入れられない間だけである。第二に血中濃度は速に低下し、それは主として肝に取り入れられ、そこで急速に分解されてしまうためらしい事、第三に、これとは逆に脳には極めて少量しか入らないし、*in vitro* でも積極的取り入れは行なわれないが、一度取り入れられたシスタチオニンは極めて徐々にしか分解されない事が推定される。これらの事は肝における du Vigneaud²⁾ の報告、脳シスタチオナーゼ（ホモセリンデアミナーゼ）活性に関する森定⁸⁾ の報告により裏書きされる。先づ第一に血液脳関門の問題であるが、以上の所見から見て、シスタチオニンは脳に入るにしても他臓器に比し血液との間に極めて高い濃度勾配を要する。即ち常識的にいつて多くの他種アミノ酸と同様に、血液脳関門の阻害を受けると云える。少量作ら侵入している事の説明は、グルタミン酸や GABA を治療目的に投与する際の理論の如く¹⁵⁾、血液脳関門という概念に余裕を持たせ、大量なら入り得ると考えるか、或いは脳下垂体、松果腺、脈絡叢の如く、機能的に中枢神経系に属さぬが故に血液脳関門の保護を受けぬと考えられている部分から入ったというような説明¹⁶⁾ を与えるかしかない様である。いづれにしろ自然界では大量のシスタチオニンが投与され得る可能性は皆無であり、又 du Vigneaud から Tallan らに至るまで、どのような生理的条件においても、それ程の高濃度のシスタチオニンが他臓器から血中に放出される事は否定されており、又、本実験でもたとえ血中に出ても速やかに肝にとられる事を知ったのであるから、少なくとも人脳内シスタチオニンが血液脳関門を通つて来たものだと考えられない事になる。又、仮りに Moore¹⁶⁾ のいう如

く、脳腫瘍組織では血液脳関門が破壊されているとしても、脳内へのシスタチオニンの積極的取り入れが行なわれないのであるから、血中の定性さえ不能な程のシスタチオニンが脳に貯溜される事は先ず考えられない。

以上の実験成績に対する考察から、少なくとも生理的条件下で脳に存在するシスタチオニンは脳外から侵入したものではなく、飽くまで脳内における代謝の問題に帰せられるべきものであると結論される。その代謝が脳自体だけの問題か、全生体との関連において考えるべきか、更に中枢神経の機能と如何なる関連において存在するのかは今後の研究をまたねばならない。

IV. 要 約

1) マウスに 50 mg/kg 体重の L-シスタチオニンを皮下注射し、その組織内分布をしらべたが、大部分は肝で分解を受け、少なくとも生理的条件下では脳以外のシスタチオニンが血液脳関門を通つて脳に侵入し得る可能性はない。

2) 脳切片を用いて L-シスタチオニンの active transport をしらべたが、これが脳に積極的に取り入れられ蓄積される可能性はない。

3) 脳に入つた L-シスタチオニンは *in vivo*, *in vitro* 共に殆んど分解されない。

終りに、御懇篤な御指導御校閲を賜つた奥村教授並びに直接実験上種々御指導御助言を戴いた大月講師に深甚の謝意を捧げます。

参 考 文 献

- 1) Brown, G. B. and du Vigneaud, V. : J. Biol. Chem. 132, 455 (1940).
- 2) Bach, S. J. 亀山他訳：高等動物のアミノ酸代謝。文光堂（昭和30年）。
- 3) Tallan, H. H., Moore, S. and Stein, W. H. : J. Biol. Chem., 230, 707 (1958).
- 4) 奥村・大月他：神経進歩 4, 606 (1960).
- 5) Gaitonde, M. K. and Richter, D. : Proc. Roy. Soc. Lond. Series B. 145, 83 (1956).
- 6) 奥村・大月他：第56回精神神経学会総会（1959）。
- 7) 渡辺：未発表。
- 8) 森定：未発表。
- 9) 森定：未発表。
- 10) Greenstein, J. P. : J. Natl. Cancer Inst. 3, 491 (1943) [2] より引用]。
- 11) Tabachnick, M. and Tarver, H. : Arch. Biochem & Biophys., 56, 115 (1955).
- 12) Awapara, J. : Arch. Biochem., 19, 172 (1948).
- 13) 塚田・永田：神経進歩 4, 518 (1960).
- 14) Hope, D. B. : J. Physiol., 141, 31 (1958).
- 15) 塚田：神経進歩 4, 525 (1960).
- 16) Bakay, L. (大友訳)：脳血液関門。医歯薬出版株式会社 (1960)。

Cystathionine in the Brain Tissue

Part 1. Entrance of L-Cystathionine into the Brain

By

Kiyoshi MATSUDA

Department of Neuro-Psychiatry Okayama University Medical School
(Director: Prof. Nikichi Okmura)

The distribution of cystathionine in blood, liver and brain was examined paperchromatographically at various intervals up to 6 hours after administration of L-cystathionine to mice. When L-cystathionine was administered subcutaneously (500 mg/kg) to adult male mice, cystathionine disappeared rapidly from the blood, while large amount of it were taken up by the liver. But in the brain tissue, scarcely significant amount of this amino acid was found even after administration of it.

On the other hand, when albino rats brain cortex slices were incubated in a medium containing L-cystathionine, cystathionine was not actively accumulated into the brain slices during the periods of more than 1 hour.

Results of these experiments suggest that cystathionine can not enter into the brain tissues of any kinds of mammalian animals under physiological conditions, and it is reasonable to assume, therefore, that the cystathionine detected in the human brain has been not absorbed from any other organs but originated in the brain itself.
