

重症感染時におけるロイシンの代謝に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9150

重症感染時におけるロイシンの代謝に関する実験的研究

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

伊 藤 雅 之

重症感染症モデルとして腹膜炎ラットを作製し、完全静脈栄養 (total parenteral nutrition, TPN) 実施時の血中分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acids, BCAA) の濃度と尿中への排泄量を測定し、また、経静脈的に投与された ^3H -ロイシン (^3H -leucine, ^3H -LEU) を血中および尿中に追跡することにより LEU の動態を検討した。腹膜炎群では血中 BCAA 濃度の有意な低下が認められ、低下した血中 BCAA 濃度は20%アミノ酸 (BCAA を21.2%含有) と15%糖液による TPN により対照群の血中濃度に是正された。また、尿中への BCAA 排泄量はアミノ酸を投与した腹膜炎群で最も増加していたが排泄量は投与 BCAA 総量の1%未満で、非腹膜炎群では血中の LEU からのケトン体生成は認められなかったが、腹膜炎群では血中 LEU からのケトン体生成が著明であった。さらに、腹膜炎群での LEU の血中消失速度は非腹膜炎群より速く、また半減期は非腹膜炎群より短縮し、腹膜炎群での LEU のエネルギー基質としての消費は非腹膜炎群の約4.8倍であった。したがって、重症感染時には BCAA とくに LEU の代謝が亢進し、生理的状态で要する4~5倍の LEU がエネルギー基質として消費されることを考慮してアミノ酸輸液の組成を決定すべきであると考えられた。

Key words sepsis, leucine metabolism, fractional disappearance rate of leucine

重症感染症や手術侵襲後には蛋白異化が亢進することが知られている¹⁾。分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acids, BCAA) の投与はその異化を抑制し、術後早期から BCAA を用いた完全静脈栄養 (total parenteral nutrition, TPN) を実施することで術後の窒素平衡を正に転ずることが可能であるとされている²⁾。また、BCAA の中でもロイシン (leucine, LEU) は最も強い蛋白の崩壊抑制と合成促進効果を有するとされている³⁻⁵⁾。しかし、侵襲時の BCAA の代謝、とくに、LEU の投与量と体内動態には未だ不明な点が多い。そこで、重症感染症モデルとして腹膜炎ラットを作製し、TPN 実施時の血中の BCAA の濃度と経静脈的に投与された LEU の動態を検討した。

対象および方法

1. 実験動物の作成法

体重 300g 前後のウィスター系雌性ラット (日本チャールズ・リバー, 東京) を用いた。腹膜炎は盲腸の結紮穿孔により起こした。すなわち、ペントバルビタール麻酔下に開腹後、盲腸を動脈ととともに結紮後19ゲージの注射針を用いて2回穿孔し糞便を圧出させ、そのまま腹腔に還納した。TPN は右頸静脈を切開して挿入留置したシリコンチューブ (内径 0.5mm, 外径 1.0mm) を投与静脈経路とした。輸液の投与速度は 10ml/kg/hr とし、自動持続注入ポンプ AIP-2H, (ATOM, 東京) を用いて24時間実施した。

II. 腹膜炎の有無ならび TPN の有無と組成による BCAA の血中濃度と尿中排泄量の検討

1. 実験群

腹膜炎の有無ならびに TPN の有無と組成により実験群を、腹膜炎を作成することなく24時間の絶食だけを実施した群 (対照群)、腹膜炎を作成することなく20%のアミノ酸輸液を含む15%糖液の TPN を実施した群 (非腹膜炎・TPN 群)、腹膜炎作成後に、15%糖液のみの組成の TPN を実施した群 (腹膜炎・非 TPN 群)、腹膜炎作成後に、20%のアミノ酸輸液を含む15%糖液の組成の TPN を実施した群 (腹膜炎・TPN 群) の4群に分けた。

アミノ酸輸液の組成は、総窒素量 15.2mg/ml, 分岐鎖アミノ酸含有量 21.2% [LEU 12.5mg/ml, イソロイシン (isoleucine, ILE) 5.6mg/ml, バリン (valine, VAL) 4.5mg/ml を含有], 必須非必須アミノ酸比1.52とした。

2. 検査項目および方法

採尿は24時間尿より採取した。TPN 終了後ペントバルビタールの過量投与により餓死させ、直ちに腹部大動脈より採決した。ただちに冷却遠心 (3000rpm, 15分間) を行い分離した1mlの血清に5%スルホサルチル酸を1.5倍量を加え振盪攪拌後、再び冷却遠心 (3000rpm, 15分間) を行い除蛋白した。その上清 1ml を 4N LiOH を加え pH 2.2 となる様に調整し、Li 型高速液体クロマトグラフィ Lc-6A (島津製作所, 京都) を用いて、血中の BCAA の濃度の測定に供した。サンプル注入量は

平成7年4月4日受付, 平成7年7月27日受理

Abbreviations: AA, amino acids; AAA, aromatic amino acids; BCAA, branched chain amino acids; BCAAT, branched chain amino acid aminotransferase; BCAAT, branched chain keto acid; BCKAD, branched chain keto acid dehydrogenase; KIC, keto isocaproic ate; ILE, isoleucine; LEU, leucine; TCA, tricarboxylic acid; TPN, total parenteral nutrition; VAL, valine

10 μ l に設定し、使用カラムは ISC-07/S1504Li (4.0mm Φ ×15 cm)、移動相にはクエン酸リチウム緩衝液を用い、ステップグラジェントで溶出した。検出は RF-530 (島津製作所、東京) を使用し、オルトフタルアルデヒド (ほう酸-炭酸緩衝液) で標識した蛍光を励起光波長 348nm、蛍光波長 450nm で測定した。尿中の BAA の測定も同様の手法で行い、一日尿量を乗じて尿中 BCAA 排泄量を算出した。

III. LEU の代謝の検討

1. 実験群

1) 対照群

非腹膜炎ラットに20%アミノ酸輸液を含む15%の糖液による TPN を8時間継続した。

2) 腹膜炎群

腹膜炎作成直後より20%アミノ酸輸液を含む15%の糖液による TPN を8時間継続した。

2. 検査項目および方法

TPN 開始後8時間目から 0.4nmol/hr の速度で L-[4, 5-³H] LEU (131Ci/nmol, Amersham, 東京) を2時間静注した。この間、TPN の組成および注入速度は不変とした。L-[4, 5-³H] LEU 静注開始後、0分、30分、60分、90分、120分 (静注終了)、150分、180分に尾静脈から 50 μ l を採血し、冷却遠心分離 (3000rpm, 15分間) 後の血清 10 μ l 中の ³H 量を測定した。また 27ゲージの膀胱内留置カテーテルを用いて採尿を行い、その 10 μ l 中の ³H 量を測定した。さらに、L-[4, 5-³H] LEU 静注終了時 (静注開始120分後) と、静注終了60分後 (静注開始180分後) に採血した血清を、前述の手技による高速液体クロマトグラフィーを用いた LEU の定量に供し、5分間隔でその抽出液 0.4ml/min を採取し、³H 量を測定した。³H 量は ACS II 液体シンチレーター (Amersham) を溶媒とし LSC-700 液体シンチレーションカウンター (アロカ、東京) を用いて比放射活性として測定した。血中からの LEU の消失速度 (fractional

disappearance rate) K は、³H-LEU 投与後120分 (t₂) における ³H-LEU (a₂) dpm、血中 LEU 濃度 (b₂) nmol/ml と投与後180分 (t₃) における ³H-LEU (a₃) dpm、血中 LEU 濃度 (b₃) nmol/ml とすると $K = (1na_2/b_2 - 1na_3/b_3) / (t_3 - t_2)$ であり、t₃-t₂=1 時間から $K = 1na_2/b_2 - 1na_3/b_3$ で求めた。また、半減期を T_{1/2} = 0.693/K (時間) として求めた。

IV. 統計学的検討

各測定値は \bar{x} , \pm SD で表した。測定値の比較検定には Student の t 検定を用い、p<0.05 をもって有意の差とした。

成 績

I. 腹膜炎の有無ならび TPN の有無と組成による BCAA の血中濃度と尿中排泄量の検討

1. 血中の BCAA 濃度

1) 血中 VAL 濃度は、腹膜炎・非 TPN 群で (0.86 \pm 0.41) $\times 10^2$ nmol/ml であり他の3群に比して有意 (P<0.01) に低下していた。

2) 血中 ILE 濃度は、腹膜炎・非 TPN 群では (0.55 \pm 0.30) $\times 10^2$ nmol/ml であり他の3群に比して有意 (P<0.01) に低下していた。

3) 血中 LEU 濃度は、腹膜炎・非 TPN 群では (0.94 \pm 0.29) $\times 10^2$ nmol/ml であり他の3群に比して有意 (P<0.01) に低下していた (図1)。

2. BACC の尿中排泄量

1) VAL の尿中排泄量は、対照群 (0.2 \pm 0.1 μ mol/日) に比べて他の3群では増加傾向を示したが有意差はなく、また、対照群以外の3群間には有意差はなかった。

2) ILE の尿中排泄量は、腹膜炎・TPN 群では 3.0 \pm 0.8 μ mol/日と、他の3群より有意 (P<0.01) 増加していた。

3) LEU の尿中排泄量は、腹膜炎・TPN 群では 10.1 \pm 1.4 μ mol/日であり、他の3群に比して有意 (P<0.05) に高く、また、対照群に比して腹膜炎・TPN 群では有意 (P<0.01) に高かった (図2)。

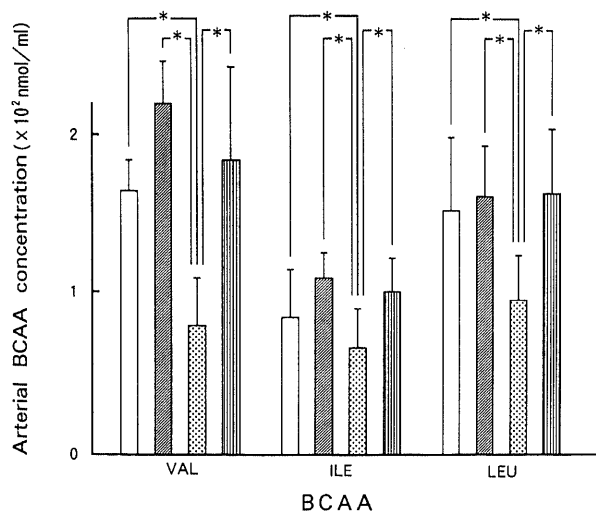


Fig. 1. Arterial branched chain amino acids (BCAA) concentrations in four groups. □, control rats [non-peritonitis rats without total parenteral nutrition (TPN)] (n=8); ■, non-peritonitis rats with TPN (n=8); ▨, peritonitis rats without TPN (n=8); ▩, peritonitis rats with TPN (n=8). VAL, valine; ILE, isoleucine; LEU, leucine. Each value represents $\bar{x} \pm$ SD. *p<0.01.

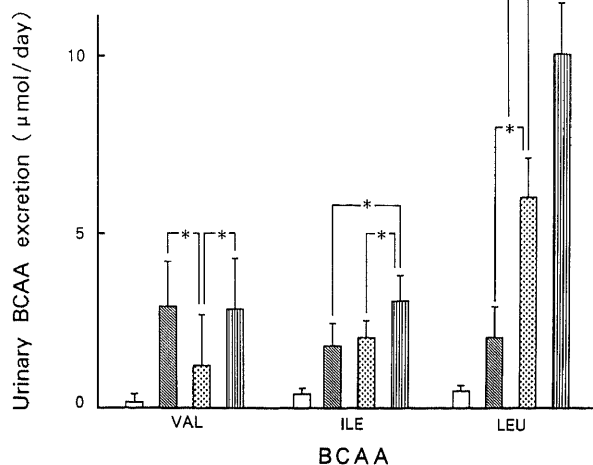


Fig. 2. Urinary BCAA excretion in four groups. □, control rats (non-peritonitis rats without TPN) (n=4); ■, non-peritonitis rats with TPN (n=4); ▨, peritonitis rats without TPN (n=4); ▩, peritonitis rats with TPN (n=4). Each value represents $\bar{x} \pm$ SD. *p<0.05.

TPN 群における BCAA 投与量は VAL 0.45 ± 0.03 nmol/日, ILE 0.77 ± 0.05 nmol/日, LEU 1.29 ± 0.09 nmol/日であり, 尿中へのアミノ酸排泄量は, 最大の排泄量を示した腹膜炎・TPN 群においても投与量の 1%未満であった。

II. LEU の代謝の検討

1. ^3H -LEU の動態

^3H -LEU 投与開始から投与終了までの血中の ^3H 放射活性は

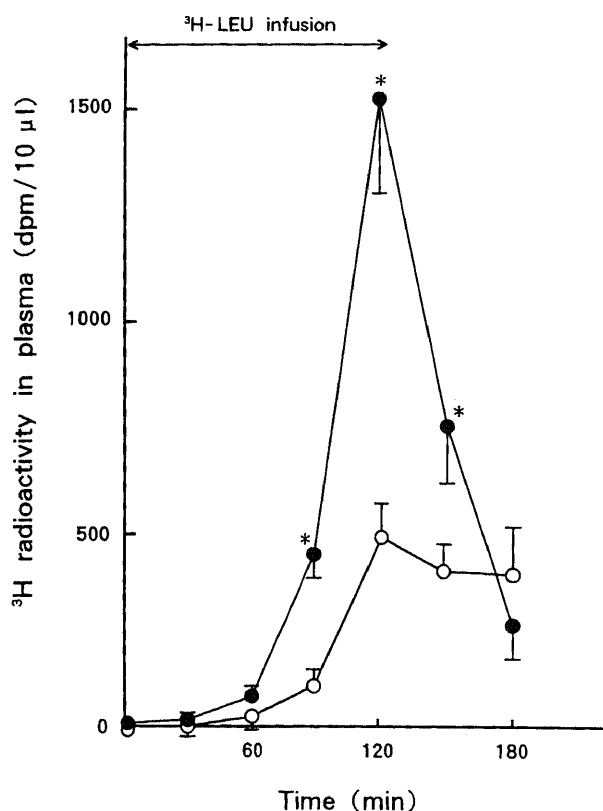


Fig. 3. Time course of incorporation of ^3H in plasma of rats with ^3H -LEU infusion. ^3H -LEU infusion was performed for 120 min (\leftrightarrow). \circ , control (non-peritonitis) rats with TPN ($n=3$); \bullet , peritonitis rats with TPN ($n=3$). Each value represents $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p < 0.05$.

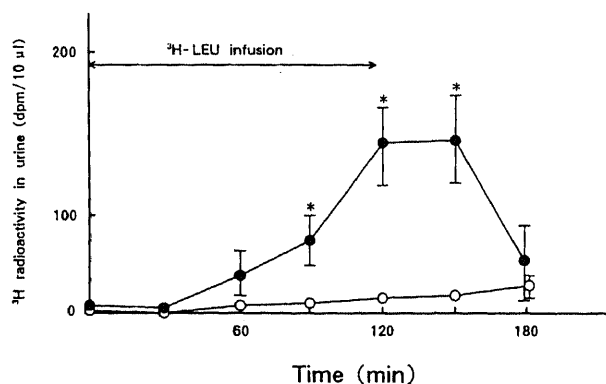


Fig. 4. Time course of incorporation of ^3H in urine of rats with ^3H -LEU infusion. ^3H -LEU infusion was performed for 120 min (\leftrightarrow). \circ , control (non-peritonitis) rats with TPN ($n=3$); \bullet , peritonitis rats with TPN ($n=3$). Each value represents $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p < 0.05$.

腹膜炎群において増加が著しく (最高値: 120分後値, 1522 ± 193 dpm/ $10\mu\text{l}$), 非腹膜炎群 (最高値: 120分後値, 498 ± 73 dpm/ $10\mu\text{l}$) の約 3 倍の ^3H 放射活性を示した。また, 120分間の ^3H -LEU 投与終了以降は, 非腹膜炎群では血中 ^3H の放射活性は維持されていたが, 腹膜炎群では急激に減少していた (図 3)。

^3H の尿中排泄量は非腹膜炎群では, ^3H -LEU 投与開始から投与終了までと投与終了以降をとおして, ほとんど ^3H 排泄が認められなかったのに対して腹膜炎群では, 血中の ^3H 放射活性と相関して ^3H の尿中排泄量の増減が認められた (図 4)。

非腹膜炎群と腹膜炎群における ^3H -LEU 投与終了時 (投与開始 120 分後) の溶出液の ^3H 放射活性を比較すると, 非腹膜炎群では LEU のフラクションに大きな集積と酸性液相のフラクション (retention time 0~10 分) に小さな集積を認めた。一方, 腹膜炎群では LEU のフラクションに小さな ^3H の集積と酸性液相のフラクションに大きな集積を認めた。 ^3H -LEU 投与終了 60 分後 (投与開始 180 分後) の溶出液の ^3H 放射活性についても同様の傾向が認められたが, 腹膜炎群では LEU のフラクションにはほとんど ^3H の集積が認められず, 血中 ^3H -LEU の代謝が亢進していることが示された。また, 非腹膜炎群と腹膜炎群の両者ともにその他のアミノ酸のフラクションへの ^3H の集積は認められなかった (図 5)。

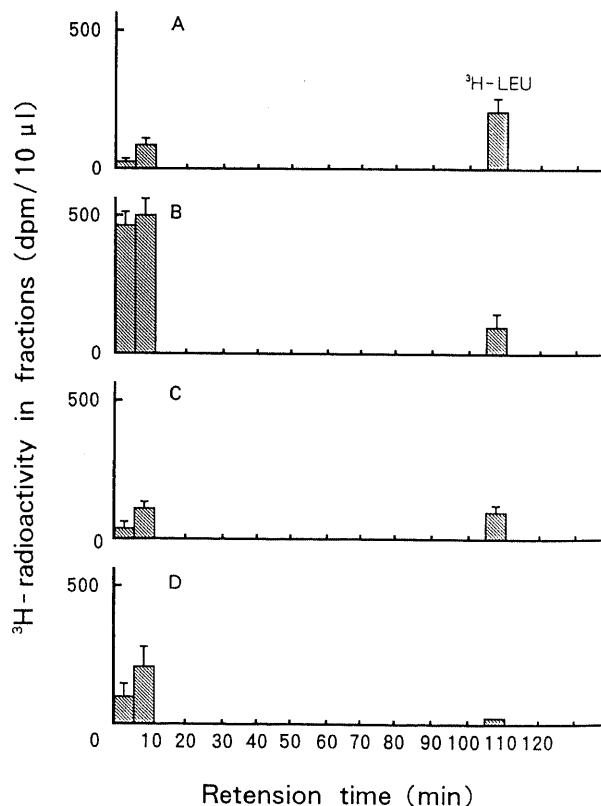


Fig. 5. ^3H -radioactivity in fractions collected during the chromatography of the samples prepared from plasma obtained 120 min (A, B) and 180 min (C, D) after the beginning of ^3H -LEU infusion. (A), (C) Control (non-peritonitis) rats with TPN ($n=3$). (B), (D) Peritonitis rats with TPN. ^3H -LEU was identified by the retention time of LEU (retention time, 105-110 min). Each value represents $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($n=3$).

Table 1. Mean values of ^3H -LEU radioactivity and LEU concentration in plasma

Group	Time at examination ^{a)} (min)	No. of rats examined	^3H -LEU radioactivity ($\bar{x} \pm \text{SD}$, dpm)	LEU concentration ($\bar{x} \pm \text{SD}$, nmol/ml)
Control (non-peritonitis) rats with TPN	120	3	227.8 \pm 7.1	177.3 \pm 7.0
	180	3	138.5 \pm 20.5	176.0 \pm 9.2
Peritonitis rats with TPN	120	3	126.2 \pm 31.2	153.7 \pm 7.4
	180	3	48.9 \pm 1.3	145.3 \pm 4.9

a) Time after the beginning of ^3H -LEU infusion, which was performed for 120 min.

同試料の血漿 LEU 濃度を測定し、LEU の血中消失速度をもとめると、非腹膜炎群で $K=0.625 \pm 0.236$ 、半減期 $T_{1/2}=1.228 \pm 0.476$ (hr) であった。腹膜炎群では $K=2.734 \pm 0.281$ 、半減期 $T_{1/2}=0.257 \pm 0.031$ であった (表 1)。

考 察

重症感染症や手術侵襲時には蛋白異化が亢進し、窒素平衡が負に傾くことが知られている⁹⁾。BCAA の投与はかかる侵襲時の蛋白異化の亢進を抑制し蛋白合成を促進するとされ、BCAA を併用した TPN を術後早期から実施することにより術後の窒素平衡を正に転ずることが可能であるとされている²⁷⁾²⁸⁾。また、BCAA のなかでも LEU が蛋白異化の抑制作用と蛋白合成促進作用を強く有していることが明らかにされ³⁾⁹⁾、他の分岐酸アミノ酸 (ILE, VAL) に比して注目されている。また、BCAA は筋組織に豊富に貯蓄され、その代謝は主に筋組織や脂肪組織で行われる。これは他の多くのアミノ酸が主に肝臓で代謝されるのとは対照的であり、筋組織に貯留された BCAA が末梢組織でのエネルギー源となっている可能性がある。とくに、LEU は代謝されてアセチル CoA とアセト酢酸となることから、ケトン体として末梢組織での注目すべきエネルギー源と考えられている⁸⁾⁹⁾。そこで本研究では重症感染症モデルとして腹膜炎ラットを作製し、TPN 実施時の血中 BCAA の濃度と尿中 BCAA 排泄量を測定し、また、経静脈的に投与された ^3H -LEU を血中および尿中に追跡することにより LEU の動態を血中 ^3H -LEU 消失速度から検討した。

今回の検討による血中 BCAA 濃度は腹膜炎・非 TPN 群において LEU, VAL, ILE の三者ともに低下していた。肝硬変症の患者における血漿アミノ酸パターンは、BCAA/芳香族アミノ酸 (aromatic amino acids, AAA) 比の著明な低下と BCAA の低下がみられ、BCAA の酸化亢進と細胞内遊離 BCAA の血中への放出低下がみられるとされている¹⁰⁾¹¹⁾。本検討における血中 BCAA 濃度の低下の機序も同様であると推測される。しかし、敗血症想定した重症感染モデルとしての腹膜炎群でも、アミノ酸 (BCAA 21.2% 含有) 投与腹膜炎群においては、対照群と同様の各 BCAA 濃度が維持されていた。細胞内のアミノ酸プールへの BCAA 供給は血中 BCAA の細胞内輸送と蛋白異化によって供出された BCAA 以外にはないため、経静脈的な BCAA 投与は細胞内のアミノ酸プールへの BCAA 供給の重要な手段である。敗血症や手術侵襲後の窒素出納の改善には高濃

度、高比率の BCAA の投与が必要であるとされている²³⁾。今回の検討からは、血中 BCAA 濃度の是正には投与アミノ酸の BCAA 濃度は 21.2% で血中 BCAA 濃度の是正は可能であると考えられる。しかし、血漿アミノ酸プールの全アミノ酸プールに占められる割合は非常に小さく、組織によって分布やアミノ酸の濃度、比率が異なること¹⁴⁾¹⁵⁾、アミノ酸の細胞外液から細胞内への輸送は能動輸送であり、通常細胞外液に比し細胞内液のアミノ酸濃度はかなり高いレベルで維持されていること¹⁶⁾ などから、血中 BCAA 濃度が生理的レベルに是正されたことだけでは BCAA の供給が十分であるとするはできない。細胞内のアミノ酸プールは敗血症時においても変化しないとされ¹⁷⁾、BCAA 酸化の亢進時には血中の BCAA 濃度を保つために蛋白異化が進むことを考慮すると、生理的血中 BCAA 濃度の維持は、尿中への BCAA 排泄量が無視できる範囲であれば、蛋白異化による BCAA 供給量 = 蛋白合成への BCAA 需要量 + BCAA 酸化への BCAA 需要量と考えることができる。

BCAA の尿中排泄は、ヒトの生理的状態において VAL 53 $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、ILE 21 $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、LEU 57 $\mu\text{mol}/\text{日}$ とされている。今回の実験では、対照群において VAL 0.2 \pm 0.1 $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、ILE 0.4 \pm 0.1 $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、LEU 0.5 $\mu\text{mol}/\text{日}$ であり、体重あたりの排泄量ではヒトとラットとは同程度の排泄量と考えられた。非腹膜炎・TPN 群においては、VAL 2.8 \pm 1.2 $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、ILE 1.7 \pm 0.6 $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、LEU 2.0 \pm 0.9 $\mu\text{mol}/\text{日}$ で、血中 BCAA 濃度と相関して排泄量は増加しており、尿中 BCAA 排泄の増減は血中 BCAA 濃度に依存していると考えられた。腹膜炎・非 TPN 群では血中 BCAA 濃度が低下しているにもかかわらず、排泄量は VAL 1.2 \pm 1.0 $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、ILE 2.1 \pm 0.4 $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、LEU 6.0 \pm 1.1 $\mu\text{mol}/\text{日}$ と対照群と比し増加していた。さらに、最大の排泄量がみられたのは腹膜炎・TPN 群であった。この理由としては、敗血症の早期における急性相反応で BCAA を利用する蛋白合成や酸化に先立って体蛋白異化による BCAA の血中への放出が起こる一過性の高 BCAA 血症が存在し¹⁹⁾²⁰⁾、また、今回の BCAA 排泄量は 1 日量として測定されたため尿中排泄量が増加した²¹⁾ ことや、敗血症時には BCAA 排泄の閾値が低下していることなどが考えられた。静脈内に注入されたアミノ酸は尿中に排泄されやすく利用されにくいとの報告もあるが²²⁾、尿中への BCAA 喪失は投与 BCAA 量の 1% 未満であり、経静脈的に投与された BCAA は十分に利用されていると推測される。

一方他のアミノ酸のほとんどが肝で代謝されるのに対し、BCAAの代謝は主に筋肉組織で行われているとされている²³⁾。BCAAの代謝の第一段階はBCAAのアミノ酸基転移による脱アミノ反応であり、その反応はBCAAアミノトランスフェラーゼ (aminotransferase, BCAAT) により各々のBCAAに対応するケト酸 (branched chain keto acids, BCKA) に変えられる。BCAATの濃度は肝組織においては低く筋肉組織では比較的高いため、組織重量の比率からいっても脱アミノ反応の大半は筋肉組織で行われると推測される²⁴⁾。代謝の第2段階では、BCKAの酸化脱炭酸反応 (oxidative decarboxylation) がミトコンドリア内のデヒドロゲナーゼ (BCKA dehydrogenase, BCKAD) によって行われる。このBCKADがBCAA酸化の律速酵素であるとされている²⁵⁾。BCAATとは異なり、BCKADの分布は肝において高く筋肉組織において低い²⁶⁾、BCAAは筋肉組織のみならず肝においても重要なエネルギー基質であると考えられる。全てのアミノ酸から生じる共通代謝中間体 (炭素骨格の代謝産物) はアセチル CoA, ピルビン酸, 2-オキソグルタル酸, スクシニル CoA, フマル酸, オキサロ酢酸に集約されるが、トリカルボン酸 (tricarboxylic acid, TCA) 回路で直接酸化される唯一の化合物はアセチル CoA である。アセチル CoA 以外の中間体はオキサロ酢酸になり、TCA回路から一旦はずれてピルビン酸となりピルビン酸デヒドロゲナーゼによりアセチル CoA になることによって酸化されるとされている²⁷⁾。すなわち、ピルビン酸デヒドロゲナーゼが阻害された場合、例えば、脂肪酸代謝が亢進している状態や糖質の利用が低下している状態では、エネルギー代謝においては直接アセチル CoA を生成するアミノ酸が利用効果が良いと考えられる²⁸⁾。LEUはBCAAの中でも直接アセチル CoA を生成するアミノ酸であり、1分子のLEUから1分子のアセチル CoA と1分子のアセト酢酸がつくられる²⁹⁾。アセト酢酸はケトン体であり肝でその一部がβヒドロキソ酪酸に変えられるが、肝では利用されないため肝から放出され好氣的組織のミトコンドリアで酸化される³⁰⁾。ケトン体は筋肉、心臓、腎臓、脳、腸管などの好氣的組織でアセチル CoA に変えられ、オキサロ酢酸とクエン酸シンターゼの働きでクエン酸となり TCA 回路で酸化される。しかし、ミトコンドリアにおけるアセチル CoA/CoA の比率の上昇はピルビン酸デヒドロゲナーゼを阻害するために糖質利用率の低下を招来する³¹⁾。この状態での過剰な糖質の投与はエネルギー代謝を改善しないばかりか高血糖による高浸透圧血症を増悪する可能性がある。LEUは体蛋白異化を抑制するとされているが、LEUのケト酸であるαイソカプロン酸 (keto isocaproic acid, KIC) やケトン体にも同程度の蛋白異化抑制作用があることが報告されている^{32,33)}。したがって、LEUの蛋白異化抑制作用はLEUの直接的作用というよりも、LEUが代謝されて生成されるケトン体もしくはアセチル CoA による抑制作用の可能性が高いと考えられる。

さらに、LEUの代謝を考える上で、LEUの炭素骨格がその他のアミノ酸の炭素骨格に利用されているか否かは重要な問題である。今回の検討で使用した L-[4, 5-³H] LEUはBCAATにより L-[4, 5-³H] KICに変わり³⁴⁾さらにBCKADによって³Hを有するアセト酢酸と³Hを有さないアセチル CoA とに分解される。アセト酢酸は肝では代謝されないため肝外の好氣的組織で代謝される。腹膜炎の有無に関わらずLEUのフラクションと酸性液相のフラクション以外の他のアミノ酸のフラクションに

³Hの集積が認められなかったことから、LEUから生産されるアセト酢酸は他のアミノ酸の炭素骨格には利用されないことが確認された。また、薛³⁵⁾はU-¹⁴C-LEUを使用した実験で筋組織の酸可溶分画中にグルタミン酸とアラニンに相当量の¹⁴Cが取り込まれたと報告した。U-¹⁴C-LEUはすべてのCが¹⁴Cでラベルされているため、分解されて生ずるアセト酢酸もアセチル CoA も¹⁴Cでラベルされている。さらに、アセト酢酸は肝以外の組織でアセチル CoA に変えられて利用されるので、LEU由来のアセチル CoA が肝外組織でTCA回路の中間体やピルビン酸になりグルタミン酸やアラニンに炭素骨格を供給しているのであれば L-[4, 5-³H] LEUの³Hもグルタミン酸やアラニンのフラクションに集積するはずである。したがって、グルタミン酸やアラニンの炭素骨格は肝におけるKIC酸化の亢進から³⁶⁾生ずるアセチル CoA をTCA回路の中間体やピルビン酸の形で利用していると推察できる。

また、今回の実験で腹膜炎ラットにおける³H-LEUの推移は³H-LEU投与終了時 (投与開始120分後) と投与終了60分後 (投与開始180分後) の1時間ではほとんど消失している。これはLEUからKICへの脱アミノ反応とKICからLEUへのアミノーションの状態を表している。すなわち、腹膜炎群では大きく脱アミノ反応に傾いていることを示している。³H-LEUの血中消失速度を求めると、非腹膜炎群では $K=0.625 \pm 0.236$, 半減期は $T^{1/2}=1.228 \pm 0.476$ (時間)、腹膜炎ラットでは $K=2.734 \pm 0.281$, $T^{1/2}=0.257 \pm 0.031$ (時間) であった。Matthews³⁴⁾はヒトに L-[1-¹³C] を経静脈的に投与し、血液中の¹³C-KIC/¹³C-LEUの比は摂取蛋白量に影響されず71-82%と一定であったと報告した。イヌの実験でも、血液中の¹³C-KIC/¹³C-LEUの比は50%と一定であったとされている³⁵⁾。動物の種によって蛋白合成と蛋白分解の速度の差はみられるため、比の大小はあってもその値は代謝動態の変化に影響されず一定であると考えられる^{36,37)}。腹膜炎群の³H-LEU投与終了時、終了60分後にみられる酸性液相のフラクションに集積する³Hは、極少量の³H-KICを除いて他のほとんどは³H-アセト酢酸と³H-β-ヒドロキソ酪酸であると考えられ、観察中に認められた尿中排泄³H量も³H-ケトン体であると推定できる。逆に、非腹膜炎群では³H-LEUが相当量認められ、³H-KIC/³H-LEUが50%~80%^{35,36)}と仮定しても酸性液相のフラクションの³Hはかなりの部分が³H-KICで、³H-ケトン体はわずかであると推定された。したがって、敗血症では経静脈的に投与されたLEUは速やかに脱アミノ反応と酸化的脱炭酸反応が行われ、ケトン体として好氣的組織でエネルギー基質に利用されていると推測された。また、今回測定されたLEUの半減期から敗血症では生理状態で必要とされるLEUの約4.8倍のLEUがエネルギー基質として消費され、さらに、LEUからの代謝中間体であるKICやケトン体をエネルギー基質として投与することも有用であると考えられた。

結 論

ラットを用いて実験的に腹膜炎モデルを作成し、重症感染時の輸液組成の相違による血中のBCAA濃度の相違と、L-[4,5-³H]-LEUを使用して非腹膜炎群と腹膜炎群におけるLEU代謝の相違を検討し、以下の結果を得た。

1. 腹膜炎群では血中BCAA (VAL, ILE, LEU) 濃度の有意な低下が認められ、低下した血中BCAA濃度は20%アミノ酸 (BCAAを21.2%含有) と15%糖液によるTPNにより对照群の

血中濃度に是正された。

2. 尿中 BCAA 排泄量はアミノ酸を投与した腹膜炎群で最も増加していたが、排泄量は投与 BCAA 総量の 1% 未満であった。

3. 非腹膜炎群では血中の LEU からのケトン体の生成は認められなかったが、腹膜炎群では血中 LEU からのケトン体生成が著明であった。

4. 腹膜炎群での LEU の血中消失速度は非腹膜炎群より速く、また半減期は非腹膜炎群より短縮し、腹膜炎群での LEU のエネルギー基質としての消費は非腹膜炎群の約 4.8 倍であった。

以上から、重症感染時には BCAA とくに LEU の代謝が亢進し、生理的状态で要する 4~5 倍の LEU がエネルギー基質として消費されることを考慮しアミノ酸輸液の組成を決定すべきであると考えられた。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また、種々の御教示と御支援を頂きました松川茂博士と能登啓文博士、終始御援助御助言を頂きました八木雅夫博士ならびに金沢大学第 2 外科学教室の学兄に心から感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第 24 回外科と代謝・栄養学会および第 3 回日本静脈・経腸栄養研究会に発表した。

文 献

- 1) Freund, H. R., James, J. H. & Fischer, J. E.: Nitrogen-sparing mechanisms of singly administered branched chain amino acids in the injured rat. *Surgery*, **90**, 237-242 (1981).
- 2) 能登啓文, 八木雅夫, 桐山正人, 嶋 裕一, 伊藤雅之, 北林一男, 宮崎逸夫: 術後蛋白異化抑制における BCAA の役割. *日本静脈・経腸栄養*, **2**, 296-299 (1987).
- 3) 広瀬和郎: 感染症に対する分岐鎖アミノ酸投与の効果. *外科と代謝・栄養*, **16**, 314-315 (1980).
- 4) Fulks, R. M., Li, J. B. & Goldberg, A. L.: Effect of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J. Biol. Chem.*, **250**, 290-298 (1975).
- 5) Tischler, M. E., Resautels, M. & Goldberg, A. L.: Does leucine, Ieucyl-tRNA or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle? *Biol. Chem.*, **257**, 1613-1617 (1982).
- 6) Moore, F. D.: The Normal Patient-convalescence, and the Metabolism of Recovery. *Metabolic Care of the Surgical Patients*, Part 1, 1st ed., pl-134, W.B. Saunders Co., Philadelphia/Hakko co Tokyo. 1959.
- 7) Cerra, F. B., Upson, D. & Angelico, R.: Branched chains support postoperative protein synthesis. *Surgery*, **92**, 192-199 (1982).
- 8) 市原 明: 分岐鎖アミノ酸の生理学. *外科と代謝・栄養*, **22**, 281-288 (1988).
- 9) Harper, A. E., Miller, R. H. & Block, K. P.: Branched chain amino acid metabolism. *Ann. Rev. Nutr.*, **4**, 409-454 (1984).
- 10) Fisher, J. E., Rosen, H. M. & Fbeid, A. M.: The

effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery*, **80**, 77 (1976).

- 11) 沖田美佐子, 渡辺明治, 辻 孝夫: 肝硬変症にみられる血漿分岐鎖アミノ酸濃度の低下の機序. *消化器外科*, **2**, 355-366 (1989).
- 12) Blackburn, G. L., Moldawer, L. L., Usui, S. & Bothe, A.: Branched chain amino acid administration and metabolism during starvation injury and infection. *Surgery*, **86**, 307-315 (1979).
- 13) 広瀬和郎: 敗血症に対するアミノ酸輸液組成に関する実験的研究. *十全医会誌*, **92**, 556-574 (1983).
- 14) Munro, H. N.: A General Survey of Techniques Used in Studying Protein Metabolism in Whole Animals and Intact Cells. *Mammalian Protein Metabolism*, 3rd ed., p237-262, Academic Press, New York, 1969.
- 15) 名取靖郎: アミノ酸プールとタンパク質代謝. *生化学実験講座*11, アミノ酸代謝と生体アミノ (日本生化学会編), 第 2 版, 257-266 頁, 東京化学同人, 東京, 1979.
- 16) Bergstrom, J.: Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J. Appl. Physiol.*, **36**, 693-697 (1974).
- 17) 唐土善郎: 組織 aminogram からみた, TPN におけるアミノ酸輸液の検討. *外科と代謝・栄養*, **16**, 70-78 (1982).
- 18) 弓狩康三, 中村朝郎, 永嶋伸也, 高見 徹, 秋山由紀雄: アミノ酸およびアミンの生体含量. *アミノ酸代謝と生体アミン*, (日本生化学編), 第 2 版, 1075-1100 頁, 東京化学同人, 東京, 1979.
- 19) Askanazi, J.: Muscle and plasma amino acids after injury. *Ann. Surg.*, **188**, 797-803 (1978).
- 20) Harkema, J. M., Gorman, M. W., Bieber, L. L. & Chaudry, I. H.: Metabolic interaction between skeletal muscle and liver during bacteremia. *Arch. Surg.*, **123**, 1415-1419 (1988).
- 21) 小林大平: 静脈内栄養におけるアミノ酸の検討. *岡山医学会誌*, **9**, 1665-1683 (1970).
- 22) 田沢三郎: 外科侵襲時における投与方法による窒素代謝変動の差異に関する臨床的研究 (重窒素標識アミノ酸をトレーサーとして). *日外会誌*, **6**, 701-714 (1971).
- 23) Harper, A. E., Miller, R. H. & Block, K. P.: Branched chain amino acid metabolism. *Ann. Rev. Nutr.*, **4**, 409-454 (1984).
- 24) Ichihara, A. & Koyama, E.: Transaminase of branched chain amino acids. *J. Biochem.*, **59**, 160-169 (1966).
- 25) Odessey, R. & Goldberg, A. L.: Oxidation of leucine by rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, **223**, 1376-1383 (1972).
- 26) 野口知雄, 城戸 亮: アミノ酸代謝. *ニューズホーム・リーチ医科生化学*, 第 1 版, 227-266 頁, 講談社, 東京, 1986.
- 27) Noda, C. & Ichihara, A.: Control of ketogenesis from amino acids. *J. Biochem.*, **76**, 1123-1130 (1974).
- 28) Bates, M. W.: Kinetics of ketone body metabolism in fasted and diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, **221**, 984-991 (1971).
- 29) Pettit, F. H. & Pelly, J. W.: Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase by acetyl CoA/CoA

and NADH/NAD ratio. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **65**, 575-582 (1975).

30) Owen, O. E. & Reichard, G. A.: Human forearm metabolism during prolonged starvation. *J. Clin. Invest.*, **50**, 1536-1545 (1971).

31) Williamson, D. H.: Muscle-protein catabolism after injury in man, as measured by urinary excretion of 3-methylhistidine. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **52**, 527-533 (1977)

32) 藤 光明: 術後早期のアミノ酸代謝の研究—筋組織を中心として. *外科と代謝・栄養*, **15**, 57-64 (1981).

33) Harper, M. A.: Biosynthesis of Amino Acids Review of Physiological Chemistry. *Physiological Chemistry*, Chap23, 16th ed., p369-390, LANGE/MARUZEN, Tokyo, 1978.

34) Matthews, D. E.: Relationship of plasma leucine and α -ketoisocaproate during a L-[^{13}C] leucine infusion in man. A method for measuring human intracellular Leucine tracer enrichment. *Metabolism*, **31**, 1105-1111 (1982).

35) Nissen, S. & Haymond, M. W.: Effects of fasting on flux and interconversion of leucine and α -Ketoisocaproate in vivo. *Am. J. Physiol.*, **241**, 72-75 (1981).

36) Schauder, P.: Pharmacokinetic and metabolic interrelationships among branched-chain keto and amino acids in humans. *J. Lab. Clin. Med.*, **106**, 701-707 (1985).

37) Nissen, S. L., Miles, J. M., Gerich, J. E. & Haymond, M. W.: Regulation of α -ketoisocaproate binding albumin in vivo by free fatty acids. *Am. J. Physiol.*, **242**, 67-71 (1982).

38) Freund, H., Yoshimura, N. & Fisher, J. F.: The effect of branched chain amino acids and hypertonic glucose infusions on postinjury catabolism in the rat. *Surgery*, **87**, 401-408 (1980).

39) Harkema, J. M., Gorman, M. W., Bieber, L. L. & Chaudry, I. H.: Metabolic interaction between skeletal muscle and liver during bacteremia. *Arch. Surg.*, **123**, 1415-1419 (1988).

Measurement of the Fractional Disappearance Rate of LEU in Peritonitis Rats Masayuki Itoh, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **104**, 476—482 (1995)

Key words sepsis, leucine metabolism, fractional disappearance rate of leucine

Abstract

Branched chain amino acid (BCAA) concentrations in plasma and excretions in urine were measured in peritonitis rats as sepsis models while receiving total parenteral nutrition (TPN). The leucine (LEU) metabolism in peritonitis was studied by measuring radioactivity in plasma and urine after infusion of ^3H -leucine (^3H -LEU) in rats. In peritonitis rats, BCAA concentrations in plasma declined significantly, and could be returned to that of control rats by receiving TPN with 20% amino acids (BCAA 21.2%) and 15% glucose. In peritonitis rats with TPN, the BCAA excretion in urine increased the most, but it accounted for under 1% of total BCAA which had been administered with TPN. In nonperitonitis rats, because of the small radioactivity of the solventfront flux, it was assumed that LEU in plasma could not be exchanged into ketone bodies, while in peritonitis rats because of the large radioactivity of the solventfront flux, it was assumed that LEU in plasma could be exchanged into ketone bodies. The fractional disappearance rate of LEU in peritonitis rats was larger than that in nonperitonitis rats, and the half-life of LEU in plasma was shortened in peritonitis rats. The consumption of LEU as energy source in peritonitis rats was estimated as 4.8-times the LEU utilized in non-peritonitis rats. BCAA, especially LEU metabolism, is stimulated in sepsis. Therefore, the amino acid composition of administered solution in the treatment of sepsis must be determined, considering that the consumption of LEU as an energy source in sepsis is about 4-5 times the value of LEU utilized in physical.