

《原 著》

$^{11}\text{CO}_2$ のグルコースと尿素への固定: ポジトロン放出性化合物の迅速分析法によるラット血液を用いた実験研究

桜川 宣男*,** 松井 晨* 河野 義恭* 有馬 正高**
 里吉栄二郎** 飯尾 正明***

要旨 $^{11}\text{CO}_2$ の体内代謝動態を調べる目的で、 $^{11}\text{CO}_2$ 連続吸入後のラット血液中代謝産物の分析を行った。血液はトリクロル酢酸で処理し、新しく開発した double column chromatography で分析した。各物質の同定には ^{14}C -標識化合物を用い、糖および尿素の定量およびアミノ酸分析を行った。 $^{11}\text{CO}_2$ 5 分間連続吸入後のラット血液中には、酸不安定成分 ($\text{H}^{11}\text{CO}_3^-$, $^{11}\text{CO}_2$, $\text{H}_2^{11}\text{CO}_3$) が 94.2 %、酸可溶性成分(中性物質、解糖系中間代謝産物)が 3.9 %および酸不溶性成分(蛋白、核酸など)が 1.9 %含まれていた。酸可溶性成分を double column chromatography で分析した結果、 ^{11}C -glucose は 44.9 %、 ^{11}C -urea が 41.4 %を占めていた。なおラジオ液体クロマトおよび Dowex (Borate) column chromatography を施行した結果、標準品として用いた ^{14}C -glucose と全く同じ溶出パターンを示したことより、 $^{11}\text{CO}_2$ -glucose の存在が再確認された。以上より吸気中の $^{11}\text{CO}_2$ がラット血液中の glucose と urea に固定されることが証明された。

I. はじめに

炭酸ガス (CO_2) は生体内において種々の代謝系に関与するが、グルコース (glu) への $^{14}\text{CO}_2$ 固定は gluconeogenesis の指標となると考えられている。最近 Rognstad¹⁾ はラット肝細胞を用いた実験により、phosphoenolpyruvate carboxykinase の反応によって L-glutamine から glu へ $^{14}\text{CO}_2$ 固定が行われると報告している。われわれは $^{11}\text{CO}_2$ がラット脳内でクエン酸回路の有機酸に固定されることを報告した²⁾。この実験において中性物質 (glu など) への RI 取り込みが観察されていたが未同定であった。そこで今回われわれは、ラットの血液を用いて、中性物質の同定法を確立し³⁾、

Rognstad¹⁾ の成績を in vivo で証明したので報告する。さらに本実験において尿素分画にも glu とほぼ同程度の RI 取り込みが観察されたので、 $^{11}\text{CO}_2$ の生体内の代謝動態について考察する。

II. 方 法

$^{11}\text{CO}_2$ ガスはベビーサイクロトロンを用いて生産され、800°C 加熱 CuO カラムに通してから用いた。Wistar ラットをガラス容器内 (2 l 末端をゴムバルーンに接続) に入れ、 $^{11}\text{CO}_2$ (50~100 mCi) を送入する。5 分間ラットを $^{11}\text{CO}_2$ に曝露した直後または20分後にラットを断頭し、ヘパリン化血液を氷上容器に採血した。血液の一部は、井戸型シンチレーションカウンターで放射能を測定した。血液 (4 ml) を 0.1 容量のトリクロル酢酸 (TCA) にてホモゲナイズし、10 分間遠心する。この TCA 処理により acid soluble fraction (酸可溶性分画) と acid insoluble fraction (酸不溶性分画) が得られ、各分画の放射能を同様に測定した。

Acid labile fraction (酸不安定成分) は、未処理血液の放射能より減算して求めた。次に酸可溶性

* 国立武藏療養所小児神経科

** 国立武藏療養所神経センター

*** 国立療養所中野病院

受付：59年5月14日

最終稿受付：59年7月18日

別刷請求先：東京都小平市小川東町4-1-1 (郵187)

国立武藏療養所小児神経科

桜川 宣男

成分を 1 N NaOH にて中和してから、double column chromatography を行った。

Double column chromatography: Dowex AG-1

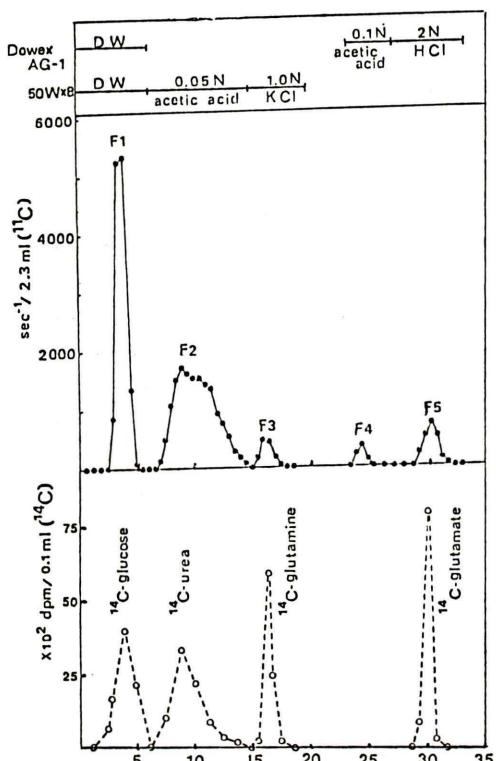


Fig. 1 Elution profile of double column chromatography. Abscissor indicates the fraction number. More details were described in the text.

カラム (ディスボシリジンジ, 10 ml) と Dowex 50 W×8 カラム (ディスボシリジンジ, 5 ml) を連結させ、蒸留水で十分に洗浄する。酸可溶性分画をカラムに流してから、蒸留水 30 ml で溶出する (fraction 1)。次にカラムの連結をはずしてから Table 1 と Fig. 1 の上段に記した順序で溶出を行った。各分画に含まれる物質の同定法は Table 1 に示した。

ラジオ液体クロマトグラフィー法：酸可溶性成分をフィルターに通してから、高速液体クロマト (柳本製)にて分析した。カラムは Aminex HPX-87 H (Bio Rad), 流速は 0.6 ml/分, 溶出液は 0.01 NH₂SO₄ である。カラム通過後の溶出液をテフロンチューブに導き、井戸型カウンターを通過させる。そしてコンピューター (CLC-5) と接続したマルチチャネルアナライザ (NAIG) にて分析した。計測時間は 1 秒で、1,000 秒間連続測定し、溶出パターンを画かせた。また高速液体クロマトより分取された溶出液の各分画 (120 μl) を井戸型カウンターで ¹¹C 放射能を測定した。

次に ¹¹C 放射能の減衰を待ってから、標準品として同時分析を行った ¹⁴C-glucose の ¹⁴C 放射能を液体シンチレーションカウンター (Packard, PRIAS) で測定した。

Borate column chromatography: Double column chromatography によって得られた fraction 1 を Dowex AG-1 カラムに再びかけてから K-

Table 1 Double column chromatography of the acid soluble fraction

| Fraction | Column | Elution | Volume | Chemical species | Identification |
|----------|--|-----------------|--------|--|---|
| 1. | Dowex AG-1 (acetate) and Dowex 50 W(H ⁺) | Distilled water | 30 ml | Glucose | ¹⁴ C-glucose Dowex (borate) column chromato. Glucose oxidase's method |
| 2. | Dowex 50 W | 0.05 N AcOH* | 40 ml | Urea | ¹⁴ C-urea Urease's method |
| 3. | Dowex 50 W | 1 N KCl | 30 ml | Neutral amino acids | Amino acid autoanalyzer |
| 4. | Dowex AG-1 | 0.1 N AcOH* | 30 ml | Not defined | Not defined |
| 5. | Dowex AG-1 | 2 N HCl | 30 ml | Glutamic acid TCA organic acid Pyruvate, lactate | ¹⁴ C-glutamic acid |

*AcOH: acetic acid.

tetraborate を加えて 5 mM の稀硼酸塩溶液とする。Dowex AG-1 カラムを硼酸塩型にしてから蒸留水で洗浄し、次に、5 mM K-tetraborate で平衡化する。上記の溶液を本カラムにかけて、5 mM, 20 mM, 30 mM さらに 100 mM の K-tetraborate

で順次溶出する。カラムの容量は 2.5 ml, 流速は 1.5 ml/分で室温にて行った。各 5 ml の分画を分取し、井戸型シンチレーターにて ¹¹C 放射能を測定した。また同時に同定用に用いた ¹⁴C-glucose は ¹¹C 放射能の減衰を持ってから、液体シンチレーションカウンターによって ¹⁴C 放射能を測定した。

III. 結 果

覚醒下の ¹¹CO₂ 吸入実験では、¹¹CO₂ 吸入量を一定に保つことが不可能であるため、ラットを ¹¹CO₂ (50~100 mCi) 混合空気に 5 分間曝露する方法を用いた。

ラット血液を TCA にて処理すると、酸不安定分画 ($H^{11}CO_3^-$, ¹¹CO₂, $H_2^{11}CO_3$)、酸可溶性分画 (glu, 尿素, 有機酸など) および酸不溶性分画 (蛋白, 核酸など) に分離できる。¹¹CO₂ 5 分間連続吸入直後の血液中には、酸不安定性成分は 94.2% (1 ml 血液中総放射能に対する百分比) 存在するが、20 分後には 61% に減少した。酸可溶性成分は、3.9% から 25.5% に増加し、¹¹CO₂ 固定が時間経過とともに増加することを示唆している (Table 2)。

次に酸可溶性成分を double column 法にて分析した結果、¹¹CO₂ 5 分間連続吸入直後の血液中には、Fraction 1 が 44.9% (酸可溶性成分の総放射能に対する百分比) と Fraction 2 が 41.4% を占めることが判明した (Table 2)。そこで、ここで示した新しく開発した double column chromatography 法について、その各分画の成分の同定を行った (Table 3)。

ブドウ糖酸化法により各 fraction のブドウ糖量を測定した結果、fraction 1 には 100 μ g/ml blood を含有し、fraction 2 と 3 は微量検出された。

Urease-diffusion 法によって尿素定量をした結果、fraction 2 にのみ 6.42 μ g/ml blood の尿素量が検出できた。またアミノ酸自動分析の結果、fraction 3 が大部分の中性アミノ酸を含有し、fraction 4 は微量のアラニン、fraction 5 はアスパラギン酸とグルタミン酸を含有していることが判明した。さらに ¹⁴C-標識の標品 (¹⁴C-glu, ¹⁴C-

Table 2 Distribution of ¹¹C-radioactivity in each fractions obtained by TCA treatment and double column chromatography

| Experiments | A(n=3-5) | B(n=2-3) |
|--------------------------------------|----------|-----------|
| Acid labile fraction ^a | 94.2±2.4 | 61.0± 1.0 |
| Acid soluble fraction ^a | 3.9±1.8 | 25.5± 3.1 |
| Acid insoluble fraction ^a | 1.9±0.7 | 13.6± 2.0 |
| Fraction 1 ^b | 44.9±2.9 | 52.9±13.9 |
| Fraction 2 ^b | 41.4±2.5 | 35.5±12.6 |
| Fraction 3 ^b | 4.1±0.5 | 0.9± 0.3 |
| Fraction 4 ^b | 1.9±0.6 | 1.6± 1.0 |
| Fraction 5 ^b | 8.2±0.9 | 9.0± 0.4 |

Experiment A used rats sacrificed soon after exposure to ¹¹CO₂ for 5 min.

Experiment B used rats sacrificed 20 min after exposure to ¹¹CO₂ for 5 min.

(a) expressed as percentile of 3 fractions obtained by TCA treatment.

Acid labile fraction was estimated by subtraction the counts of acid soluble and insoluble fractions from total counts.

(b) expressed as percentile of each fraction obtained by double column chromatography of acid soluble fraction.

Table 3 Blood contents of amino acids, glucose and urea

| Fraction | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------|-------|-------|-------|-----|------|
| Asp. | ND | ND | 0.5 | ND | 33.0 |
| Glu. | ND | ND | 5.5 | ND | 18.8 |
| Gly. | ND | ND | 13.0 | ND | ND |
| Ala. | trace | trace | 18.5 | 1.7 | ND |
| Val. | trace | ND | 10.5 | ND | ND |
| Met. | ND | ND | 2.5 | ND | ND |
| Ileu. | ND | ND | 3.5 | ND | ND |
| Leu. | ND | ND | 6.0 | ND | ND |
| Tyr. | ND | ND | ND | ND | ND |
| Phen. | ND | ND | ND | ND | ND |
| Cit. | ND | ND | 8.0 | ND | ND |
| Glucose | 100 | trace | trace | ND | ND |
| Urea | ND | 6.42 | ND | ND | ND |

Units expressed as μ g/ml blood. ND, not detectable.

urea, ^{14}C -glutamine, ^{14}C -glutamate)による分離同定を行った結果, fraction 1 には ^{14}C -glu, fraction 2 には ^{14}C -urea, fraction 3 には ^{14}C -glutamine, さらに fraction 5 には ^{14}C -glutamate が溶出されることが判明した(Fig. 1).

以上より double column chromatography は, ポジトロン放出化合物の分析に必要な迅速かつ精度の高い分離法であり, 特に中性物質の分離定量には適切な方法であることが証明された. 結果として, $^{11}\text{CO}_2$ 吸入後のラット血液中には, ^{11}C -glu と ^{11}C -尿素への固定がほぼ同率に行われていることが判明した.

次に酸可溶性成分をラジオ液体クロマトグラフィーによって分析した結果, 溶出されたフラクションの溶出パターンと, ^{14}C -glu の溶出パターンとも一致しており, $^{11}\text{CO}_2$ 吸入後の血液中に ^{11}C -glu として固定されている事実が証明された (Fig. 2).

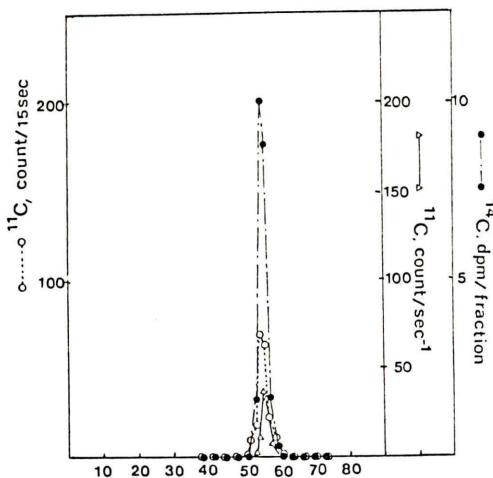


Fig. 2 Elution profile of radio-liquid-chromatography. Column; Aminex HPX-87H (Bio-Rad). Flow rate; 0.6 ml/min. Elution buffer; 0.01N H_2SO_4 . Elution profile from fractionated samples was obtained by measurement ^{11}C ($\circ\cdots\circ$) with well-type gamma scintillation counter and ^{14}C ($\bullet\cdots\bullet$) with liquid scintillation counter. $\triangle-\triangle$ indicated the elution profile of radio-liquid chromatography obtained by using MCA system (NAIG) with a computer (CLC-5).

またdouble column chromatography の fraction 1について, Borate column chromatography を施行した結果, 100 mM K-tetraborate にて ^{11}C -化合物が溶出され, この物質は ^{14}C -glu と全く同

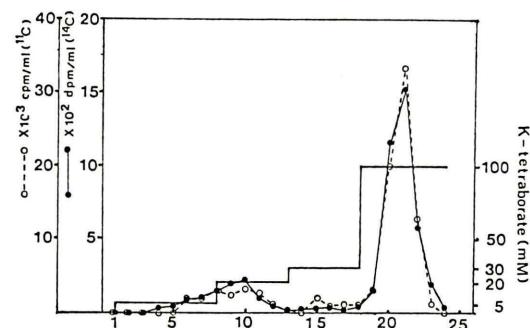


Fig. 3 Step-wise elution profile of Dowex AG-1 (Borate) column chromatography. ^{14}C -glucose was eluted at the same time for identification. $\circ\cdots\circ$ indicates the ^{11}C -count profile and $\bullet\cdots\bullet$, the ^{14}C -counts profile.

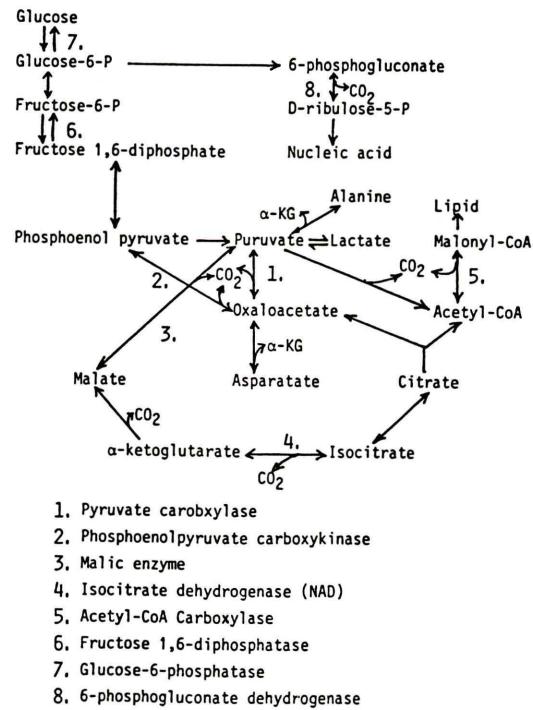


Fig. 4 Area of intermediate metabolism involving CO_2 as a crucial component and various CO_2 fixation enzymes.

じ溶出パターンを示したことより、この ^{11}C -化合物は $^{11}\text{C-glu}$ と同定された。

IV. 考 察

CO_2 は血液中へ単純溶解（拡散定数は酸素の20倍）する一方、Carbonic anhydrase の作用により HCO_3^- となって炭酸一重炭酸緩衝系として重要な役割を果たす。また CO_2 はクエン酸回路における好気的解糖系の最終産物として血液中に放出されるが、一方ではブドウ糖新生系に炭素骨格を提供し、いわゆる $^{11}\text{CO}_2$ 固定が行われることが証明されている²⁾。このように CO_2 はエネルギー代謝の主要反応系に関与し、一部再利用される訳であるが、その生理学的意義はあまり明らかではない。また従来の CO_2 に関する研究は ^{14}C -bicarbonate を用いた in vitro 実験が多く、また

in vivo 実験では麻醉下で行われることが多かつたため、糖代謝研究としては問題が残る。

そこでわれわれは carrier free のポジトロン放出性化合物である $^{11}\text{CO}_2$ を用いて、自然の状態（覚醒下）での実験を行った。

$^{14}\text{CO}_2$ を用いた実験により、 ^{14}C が P-enolpyruvate carboxykinase の反応系において固定され、さらにブドウ糖新生系においてその炭素骨格に ^{14}C を提供することが証明されている²⁾。この実験はラット肝細胞を用いた $^{14}\text{CO}_2$ 固定実験であり、グルコースへの $^{14}\text{CO}_2$ 固定が、ブドウ糖新生の指標になり得ると考えられている。われわれは $^{11}\text{CO}_2$ 吸入後のラット血液中に、 $^{11}\text{C-glu}$ の存在を証明したが、これはおそらく肝臓および腎臓におけるブドウ糖新生の結果、 $^{11}\text{CO}_2$ が固定されて $^{11}\text{C-glu}$ となり、血中に放出されたものと考えられる。

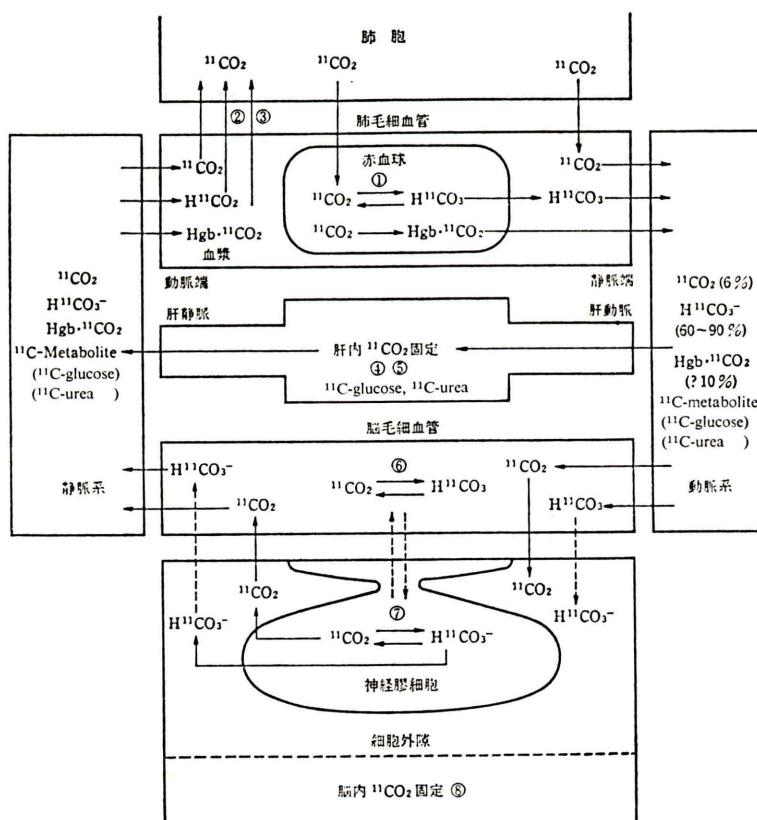


Fig. 5 Schematic model of human $^{11}\text{CO}_2$ metabolism.

えられる。従来の報告による、 $^{11}\text{CO}_2$ 固定に関与する酸素反応系を Fig. 4 に示した。Rognstad¹⁾は、乳酸とグルタミンからの CO_2 固定がブドウ糖新生系の主要な反応であると報告している。なお脳内では oxaloacetate と oxalosuccinate のレベルにおける $^{11}\text{CO}_2$ 固定が考えられており⁴⁾、糖新生は証明されていない。しかしラット血中に $^{11}\text{CO}_2$ 固定された $^{11}\text{C-glu}$ の存在を証明できたことにより、脳へのエネルギー源として血中 $^{11}\text{C-glu}$ が利用されている可能性は否定できなくなった。このように in vivo 実験による脳内 $^{11}\text{CO}_2$ 固定に関する研究は、血中由來の $^{11}\text{C-glu}$ の関与を検討する必要があると考える³⁾。

一方 ^{11}C -尿素への $^{11}\text{CO}_2$ 固定もおそらく肝臓で行われる。すなわち carbamoyl phosphate synthetase の触媒作用により $^{11}\text{CO}_2$ が NH_3 と反応して、carbamoyl phosphate が作られ、尿素サイクルに入りて尿素となり、血中に放出されたと考えられる。このように $^{11}\text{CO}_2$ は NH_3 の解毒機構にも重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで $^{11}\text{CO}_2$ 代謝動態の模式図を Fig. 5 で示した⁵⁾。最近われわれのグループは、 $^{11}\text{CO}_2$ による dynamic positron emission tomography⁵⁾を行っているが、画像解釈にあたり、 $^{11}\text{CO}_2$ 代謝動態を理解する必要がある。特に $^{11}\text{CO}_2$ 吸入直後の画像は局所脳血流量を反映すると考えられているが、 $^{11}\text{CO}_2$ 吸入30分後で、 $^{11}\text{CO}_2$ 代謝産物が脳内総放射能の30%に達するといわれている⁶⁾。この場合、先に述べたごとく、血中 $^{11}\text{C-glu}$ の果たす役割については、全く未解決であり、今後研究される必要がある。このように最近 Positron emission tomography の普及により、その臨床応用の重要性が増大してきたが、画像解釈にあたって、使用しているポジトロン放出性薬剤または化合物の生体内における代謝動態の基礎的研究が不可欠である

ことを強調したい。

V. 結 語

$^{11}\text{CO}_2$ の代謝動態を研究する目的で、ラットを用いた $^{11}\text{CO}_2$ 吸入実験を行った。まずポジトロン放出性化合物の分析にあたり、迅速でかつ精度の高い方法を確立した。本研究の結果、吸気中の $^{11}\text{CO}_2$ が、ラット血液中の glu および尿素に固定されることが証明された。この成績を基にして、 $^{11}\text{CO}_2$ 代謝動態の模式図を作成して考察を加えた。

本研究は昭和58年度厚生省神経疾患研究委託費 No. 83-12によって行われた。

本論文の要旨は昭和58年9月23日～25日、高槻市で開催された第23回日本核医学会総会で発表した。

文 献

- Rognstad R: $^{14}\text{CO}_2$ fixation by phosphoenolpyruvate carboxykinase during gluconeogenesis in the intact rat liver cell. *J Biol Chem* **257**: 11486-11488, 1982
- 河野義恭、桜川宣男、松井 晨、他：中枢神経系における $^{11}\text{CO}_2$ ガスの代謝研究——ラット脳内の $^{11}\text{CO}_2$ 固定の可能性——. 核医学 **20**: 361-365, 1983
- Sakuragawa N, Matsui A, Arima M, et al: Dynamic metabolism of ^{11}C -carbon dioxide and its metabolic fixation into the organic compounds. Third symposium on medical application of cyclotrons. Turku, Finland June 13-16, 1983. Proceeding in press.
- Chen S-C, Naruse H, Brunner SA: Effects of sodium thiopenthal on the tricarboxylic acid cycle metabolism in mouse brain: CO_2 fixation and metabolic compartmentation. *J Neurochem* **30**: 1519-1593, 1978
- 桜川宣男： $^{11}\text{CO}_2$ による dynamic positron emission tomography とその生化学的背景について. 神経研究の進歩 **28**: 258-267, 1984
- Lockwood PH, Finn RD: ^{11}C -carbon dioxide fixation and equilibration in rat brain: Effects on acid-base measurements. *Neurology (NY)* **32**: 451-454, 1982

Summary

Incorporation of $^{11}\text{CO}_2$ into Glucose and Urea: Experimental Study by Using Rat Blood which was Analyzed by Newly Developed Methods for Positron Emitting Chemical Compounds

Norio SAKURAGAWA*,**, Akira MATSUI*, Yoshiyasu KONO*, Masataka ARIMA**, Satoyoshi EIJIRO* and Masaaki IIO***

**Department of Pediatric Neurology, National Musashi Institute for Mental Diseases*

***National Center for Nervous, Mental and Muscular Disorders*

****National Nakano Chest Hospital*

In order to clarify the $^{11}\text{CO}_2$ dynamic metabolism in vivo, we performed the experimental studies by using rats which were exposed to $^{11}\text{CO}_2$ for 5 minutes. Rats were sacrificed soon after $^{11}\text{CO}_2$ exposure. Blood was collected in a heparinized glass container, homogenized with 0.3 M trichloro acetic acid on ice and separated by centrifugation ($4,000 \times g$ for 10 min) into the clear supernatant, acid soluble (A-S) fraction, and pellet, acid-insoluble (A-I) fraction. ^{11}C -content of a part of blood was measured by well-type scintillation counter as well as A-S and A-I fraction. An acid-labile (A-L) fraction was estimated by subtraction of A-S and A-I fraction from the ^{11}C -counts of the total blood and appropriate half-life correction was made. A-L fraction ($\text{H}^{11}\text{CO}_3^-$, $^{11}\text{CO}_2$, $\text{H}_2^{11}\text{CO}_3$) was 94.2% of the total blood count, A-S fraction (neutral substance, intermediates of glycolysis), 3.9% and A-I fraction (protein, nucleic acid etc), 1.9%

respectively. Then A-S fraction was applied to the double column chromatography, which composed of Dowex AG-1 (upper column) and Dowex 50 W \times 8 (lower column). It gave the 5 different fractions which were identified by using ^{14}C -labelled compounds. Major components in the A-S fraction was ^{11}C -glucose (44.9%) and urea (41.4%). Furthermore, ^{11}C -glucose was identified by radioliquid column chromatography and Dowex (Borate) column chromatography.

We interpret these data to suggest that $^{11}\text{CO}_2$ was incorporated into urea in the liver and into glucose in the liver and kidney. Incorporated ^{11}C -glucose was carried out through the body, even into the brain. We proposed the $^{11}\text{CO}_2$ dynamic metabolism in human and made its schematic presentation which probably is useful for $^{11}\text{CO}_2$ dynamic positron emission tomography.

Key words: $^{11}\text{CO}_2$, CO_2 fixation, Glucose, Urea.