

D-アミノ酸の微量分析法の確立

及び

ラット脳内における分布と動態の解析

浜瀬 健司

D-アミノ酸の微量分析法の確立

及び

ラット脳内における分布と動態の解析

浜瀬 健司

## 目次

### 略語表

第一章 緒言	— 1
第二章 生体内D-アミノ酸の微量分析法の確立	— 6
2-1 序	— 6
2-2 標品を用いたアミノ酸の光学分割	— 7
2-3 生体試料中の微量D-アミノ酸分析法の確立	— 12
2-4 考察	— 23
第三章 ラット脳内におけるD-アミノ酸の分布	— 25
3-1 序	— 25
3-2 ラット脳内におけるD-アミノ酸の分布	— 25
3-3 考察	— 30
第四章 ラット脳内D-アミノ酸の週齢変化	— 34
4-1 序	— 34
4-2 ラット脳内D-アミノ酸の週齢変化	— 34
4-3 考察	— 36

第五章	ラット松果体中D-Asp及びD-Leuの種々の 薬物投与時における含量変化	— 42
5-1	序	— 42
5-2	$\beta$ アゴニスト投与による松果体中 D-Asp、D-Leuの含量変化	— 42
5-3	松果体中D-Asp、D-Leu含量の麻酔薬による変化	— 44
5-4	考察	— 47
第六章	松果体マイクロダイアリシス法を用いた 細胞外D-Asp量の測定	— 51
6-1	序	— 51
6-2	松果体マイクロダイアリシス法を用いた 細胞外D-Asp量の測定	— 51
6-3	考察	— 57
第七章	総括	— 58
	実験の部	— 64
	引用文献	— 77
	謝辞	— 84

## 略語表

本論文においては以下に示す略語を使用した。

$\alpha$ : separation factor

ACSF: artificial cerebrospinal fluid

BBB: blood brain barrier

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

em: emission wavelength

ex: excitation wavelength

f: femto ( $10^{-15}$ )

FDAA: 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide

GC: gas chromatography

i.p.: intraperitoneal

k': capacity factor

n: nano ( $10^{-9}$ )

NBD-F: 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NPY: neuropeptide Y

ODS: octadecyl silica

OPA: *o*-phthaldialdehyde

p: pico ( $10^{-12}$ )

saline: 0.9% NaCl in water

SD: Sprague-Dawley

S.E.M: standard error of mean

SPF: specific pathogen free

TFA: trifluoroacetic acid

THF: tetrahydrofuran

TLC: thin layer chromatography

UV: ultraviolet

VIP: vasoactive intestinal peptide

アミノ酸略語表 カッコ内は一文字表記

Ala: alanine, (A)

Arg: arginine, (R)

Asn: asparagine, (N)

Asp: aspartic acid, (D)

Cys: cysteine, (C)

Gln: glutamine, (Q)

Glu: glutamic acid, (E)

Gly: glycine, (G)

His: histidine, (H)

Ile: isoleucine, (I)

Leu: leucine, (L)

Lys: lysine, (K)

Met: methionine, (M)

Phe: phenylalanine, (F)

Pro: proline, (P)

Ser: serine, (S)

Thr: threonine, (T)

Trp: tryptophan, (W)

Tyr: tyrosine, (Y)

Val: valine, (V)

## 第一章 緒言

太古の昔、原始地球においてアミノ酸は非生物的に合成されたと考えられている。また、このアミノ酸の存在無くしては、現在の生命システムは生じ得なかったと考えられている。アミノ酸は特殊なものを除き $\alpha$ 炭素に光学活性中心を持ち、初めに非生物的に合成された時には光学異性体であるD体とL体が等しく存在したとされている。しかし生命はその進化の途上において、いつしかL体に偏って利用する様になった。

人類の科学知識の中でアミノ酸が登場するのは、1817年に偶然アスパラギンが発見されたことに始まる。以後約100年をかけて蛋白質を構成する重要なアミノ酸20種が同定された。また、生体を構成するアミノ酸はL体のみであり、D体は「非天然型」として実験室で合成するときのみ生じるとされてきた<sup>1)</sup>。しかしその後の研究において様々な生物中から、遊離のD-アミノ酸や、蛋白質、ペプチド等に含まれた結合型のD-アミノ酸残基が次々と発見され、すでに「非天然型」とは呼べなくなっている。

微生物においては細胞壁のペプチドグリカン中にD-アラニンとD-グルタミン酸が含まれていること<sup>2)</sup>、多くの微生物が産生するペプチド抗生物質中にD-アミノ酸残基が存在すること<sup>2)</sup>等が明らかになった。更にこれらの微生物中にはアラニンラセマーゼ (EC 5.1.1.1)をはじめ、種々のアミノ酸ラセマーゼ並びにアミノ酸エピメ

ラーゼが存在することも示された<sup>3)</sup>。また、植物中にD-トリプトファンやD-ロイシン、D-アラニン等が存在することも明らかにされ<sup>3)</sup>、環形動物や節足動物においてもD-セリンやD-アラニンの存在が報告されてきた<sup>1)</sup>。しかし高等動物、特に哺乳類においてはD-アミノ酸が発見されなかったため、進化的に古い生物のみが原始生物が持っていたであろうD-アミノ酸利用能力を保持し続けていると考えられていた。

一方、D-アミノ酸を代謝するD-アミノ酸オキシダーゼの存在が示され<sup>4)</sup>、バクテリアからヒトに至るまでほとんど全ての生物がこの酵素を持つことが明らかになった。この酵素は、D体を特異的に酸化して2-オキソ酸 ( $\alpha$ -ケト酸) を生成する。前述のように高等動物ではD-アミノ酸は存在しないとされていたので、発見当初はこの酵素の存在意義は全く不明とされた。

このような背景の下で、1965年Hoeprichはモルモットとマウスの血清中からD-アラニンを発見し<sup>5)</sup>、哺乳類におけるD-アミノ酸の存在を初めて明らかにした。この報告により、D-アミノ酸が哺乳類も含めて広く生物中に存在することが示された。しかし、HoeprichはこのD-アラニンは腸内細菌由来であると結論し、積極的に生体内で機能しているとは考えなかった。その後、ヒトの歯のエナメル質と象牙質<sup>6)</sup>、目の水晶体<sup>7)</sup>等において非常に代謝回転の遅い蛋白質中にD-アスパラギン酸残基が発見されたが、これらは年齢と共に増加するため、化学的ラセミ化によって生じると考えられ

た。しかし近年、代謝回転の速い脳<sup>8)</sup>や赤血球膜等<sup>9)</sup>の蛋白質中からもD-アスパラギン酸残基が発見され、またD-アミノ酸残基が活性発現に不可欠な神経ペプチド等が次々と発見された<sup>10)</sup>。ここでようやくD-アミノ酸が、単なるラセミ化や外界から受動的に受け入れたものではなく、高等動物において生体が積極的に利用し、何らかの役割を担うものであると考えられるようになった。

遊離型のD-アミノ酸のうち、現在高等動物で広く認められているものはD-アスパラギン酸、D-セリン、D-アラニンであり、その他D-グルタミン酸、D-リジン等が存在したとする報告もある。

D-アスパラギン酸は血中を始め大脳、小脳、腎臓、副腎等様々な組織に広く分布することが示されている<sup>11) 12)</sup>。その生理的意義は未だ明らかになってはいないが、各組織で成熟期に一過性に出現しその後減少する傾向が見られるため、組織の成長、分化などの過程で働いているのではないかと考えられている。また、Dunlop等により、鶏卵胚の網膜部位にも一過性の上昇が認められた<sup>11)</sup>。鶏卵は外界から完全に隔離された組織であることから、これらのD-アスパラギン酸の生体内における生成が示唆されている。

D-セリンも中枢及び末梢組織に広く分布するが<sup>12)</sup>、特に大脳に多く分布する。脳内における存在部位はグルタミン酸レセプターのサブタイプであるNMDAレセプターの分布とほぼ一致し<sup>13)</sup>、更にNMDAレセプターのグリシン結合部位に結合してレセプター応答を促進することが示されている<sup>14)</sup>。また、D-セリンに対する特異的

な抗体及び [ $^3\text{H}$ ] D-セリンを用いて、内在性のD-セリンがNMDAレセプターの近傍に位置するグリア細胞の一種であるタイプ2-アストロサイトに存在することが明らかになっている<sup>15)</sup>。これらの一連の実験により、中枢神経系におけるD-セリンはNMDAレセプターグリシンサイトに対する内在性のリガンドではないかと考えられている。

D-アラニン<sup>5)</sup>は古くから血中等で認められていた<sup>5)</sup>が近年腎臓<sup>16)</sup>、<sup>17)</sup>でもその存在が示された。ヒト血漿中のD-アラニン量は腎障害により増加することが示され<sup>18)</sup>、またヒト脳内D-アラニンはアルツハイマー病患者の灰白質で特異的に増加することも明らかになっている<sup>17)</sup>。他のD-アミノ酸に関してはD-グルタミン酸<sup>19)</sup>、D-リジン<sup>20)</sup>等が存在したとする報告があるが、その意義などについては全く不明である。

この様に現在までに哺乳類を含めた様々な生物中からD-アミノ酸の存在が示され、その生理的役割についても次第に明らかになってきた。しかし遊離のアミノ酸では、限られたアミノ酸でしか研究が進んでいないのが現状である。これは生体試料中ではD-アミノ酸が微量成分であるのに対し、大量のL-アミノ酸と生体由来の様々な夾雑物が存在するためD-アミノ酸定量が非常に困難であり、現時点では全てのD-アミノ酸を満足に定量できる方法が無いことに起因する。しかも現段階においては生体内のどの部位にどのD-アミノ酸が存在するかが確定していないため、D-アミノ酸を総合

的に解析するためには、全てのD-アミノ酸に対し高感度かつ正確に分析できるシステムが期待される。

この様な観点から本研究ではまず全てのD-アミノ酸を対象とした微量分析法の開発を試みた（第二章）。次にこれを用いて、近年D-アミノ酸の働きに興味を持たれているラット脳組織を対象としてD-アミノ酸の分布を調べた（第三章）。更にD-アミノ酸の機能を調べるための一環として週齢変化（第四章）、並びに種々の薬物投与時の含量変化を調べた（第五章）。またマイクロダイアリシス法により松果体におけるD-アスパラギン酸の細胞外濃度推移を調べた（第六章）。以下それぞれの検討結果について各章で記述する。

## 第二章 生体内D-アミノ酸の微量分析法の確立

### 2-1 序

生体試料中のD-アミノ酸分析法としては、古くはD-アミノ酸オキシダーゼとTLCを併用する方法<sup>4)</sup>や、chirasil-L-valine等のキラル固定相を用いたGC<sup>2,1)</sup>等が汎用されていた。現在ではHPLCによるジアステレオマー法やキラル固定相法、及びノンキラルなHPLCとD-アミノ酸オキシダーゼを組み合わせる方法が用いられている。

このうち、ジアステレオマー法はFDAA(1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide)や、OPA(*o*-phthaldialdehyde)とキラルチオール化合物を用いてアミノ酸をジアステレオマーとし、ODSカラムで分析する方法であり、簡便かつ安価であるために最も汎用されている<sup>1,6), 2,2)</sup>。しかしこの方法ではジアステレオマーとした微量D-アミノ酸を単独で定量するため生体由来の夾雑物の影響を完全に避けることが難しく、特に微量成分については正確な定量が困難である。長田等<sup>1,6)</sup>はFDAAによるジアステレオマー法を改良し、二次元TLCからの抽出を取り入れることにより夾雑物の影響を抑えたが、操作の煩雑性とUVによる検出のため微量分析には適さなかった。

キラル固定相法は、キラルな固定相を用いてアミノ酸をジアステレオマーに導くことなく光学分割する方法であり、当教室の福島等によってPirkle typeキラル固定相とNBD-F(4-fluoro-7-nitro-2,1,3-

benzoxadiazole)による蛍光誘導体化を用いた高感度かつ簡便な方法が開発されている<sup>20)</sup>。しかしこの方法では異種アミノ酸間の分離が不完全であり、また塩基性アミノ酸であるHis、Argは分析できなかった。

アミノ酸オキシダーゼを用いた方法では酵素の基質特異性が低いため、個々のD-アミノ酸を定量するためにはHPLCの併用が必要であり、かつ微量定量も困難であった<sup>17) 23)</sup>。

本研究ではD-アミノ酸を総合的に解析するため、全てのD-アミノ酸について高感度かつ正確に分析可能な系の開発を試みた。生体中の微量D-アミノ酸を分析するためには高感度分析法は不可欠であり、この点でNBD-Fによる蛍光誘導体化を用いた福島等の方法<sup>20)</sup>は優れている。NBD-Fは当研究室の今井等<sup>24)</sup>によって開発された蛍光誘導体化試薬であり、そのNBD誘導体は励起波長470nm、蛍光波長530nmと長波長域に存在するため、生体由来の蛍光物質の妨害をほとんど受けることなく微量分析が可能である。そこでこの福島等の方法に基づき、その適用範囲を広げると共に個々のアミノ酸の分離を試み、生体試料中の各D-アミノ酸を、高感度かつ正確に定量可能な方法の開発を試みた。

## 2-2 標品を用いたアミノ酸の光学分割

当研究室の福島等はPirkle typeキラル固定相とNBD-Fによるアミノ

酸の蛍光誘導体化を用い、14種類のアミノ酸について光学分割を行った。これらのアミノ酸について対掌体の分離は達成されたものの、異種アミノ酸間の分離が不完全であり、一斉分析は困難であった。

NBD-Fによる蛍光誘導体化ではTrpは蛍光が消光すること、またCysは側鎖SH基とも反応しシングルピークにならないことが知られている。そこで本研究では、生体内で重要な20種のアミノ酸からTrp、Cys及び本来光学異性体の存在しないGlyを除いた17種を分析対象とした。この17種のアミノ酸について、まず標品を用いて光学分割を行い本方法の適用範囲の拡大を試みた。

#### 2-2-1 酸性、中性アミノ酸及びリジンの光学分割

福島等が光学分割を達成していたアミノ酸は酸性アミノ酸、Asnを除く中性アミノ酸及びリジンの14種であった。そこでまずこれらのアミノ酸の光学分割を追試すると共にAsnの光学分割を試みた。各アミノ酸はNBD-Fを用いて蛍光誘導体化し、NBD-アミノ酸とした (Fig.1)。得られたNBD-アミノ酸についてPirkle typeキラル固定相カラムであるSumichiral OA-2500Sもしくは光学認識部位に逆の立体配置を持ったSumichiral OA-2500R (Fig.2)を用いて光学分割を行った。使用したHPLCシステムはFig.3に示す。その結果Asnを含め、上記15種類のアミノ酸は良好に光学分割された。Asnを光学分割

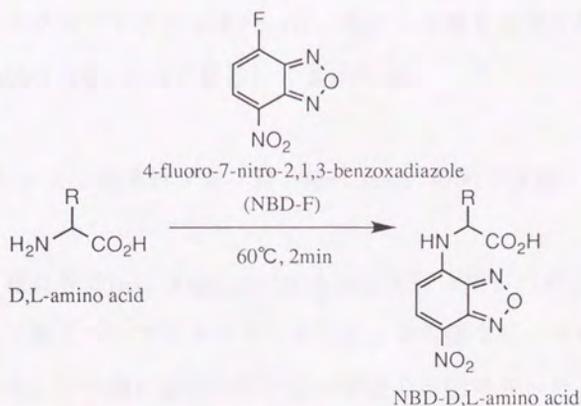


Fig.1 Derivatization of amino acids with NBD-F

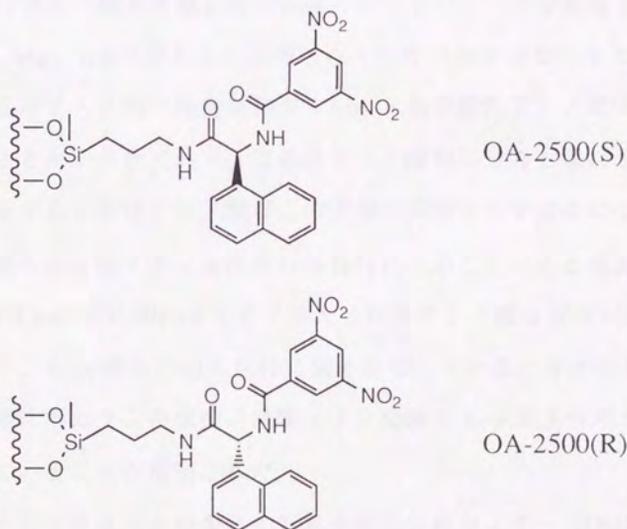


Fig.2 Structures of Piracle type chiral stationary phase  
Sumichiral OA-2500(S) and (R)

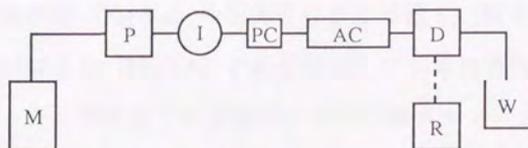
したクロマトグラムをFig.4に、各アミノ酸を光学分割した結果をTable.1 (2-2-2に提示)にまとめた。

### 2-2-2 塩基性アミノ酸 (His、Arg) の光学分割

福島等はHis、Argについても検討を行っていたが、この2種のアミノ酸についてはクロマトグラム上に明確なピークを示さなかったため、どの様に溶出しているかは全く不明であった。筆者もこれを追試したところ、同様に明確なピークは確認できなかった。しかし他のアミノ酸と比較し溶出先端のピークパターンが異なっていたため、His、Argはほとんど保持されていないのではないかと考えた。

他のアミノ酸の保持挙動からAsp、Glu等酸性アミノ酸は保持が強いことが示されており、塩基性アミノ酸がほとんど保持されないと仮定すると中性アミノ酸はこの中間の保持を示すことになる。これは明らかに陰イオン交換性の保持特性を示していると考えられる。またLysの様にNBDが2分子導入されるアミノ酸も保持が強いことから、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用も保持に強く影響していると考えられた。この様に本カラムの保持には陰イオン交換と $\pi$ - $\pi$ 相互作用が強く働いていることが推察された。

そこで本カラムの製造元である住化分析センター (Osaka, Japan) に本カラム充填剤の製造過程を尋ねたところ、はたしてFig.5に示す様にSumichiral OA-2500Sの全構造のうちナフチルグリシン以降のキ



M: mobile phase, 0.05mM-10mM citric acid / MeOH; flow rate, 0.5ml-1.0ml / min  
 P: pump, Hitachi L-6000 I: injector, Rheodyne 7125  
 PC: precolumn, Tosoh ODS-80T<sub>M</sub> 3.2mm i.d. × 1.5cm; temperature, ambient  
 AC: analytical column, Sumichiral OA-2500S or R 4.6mm i.d. × 25cm; temperature, ambient  
 D: detector, JASCO FP-920; ex 470nm, em 530nm R: integrator, JASCO 807-IT W: waste

Fig. 3 HPLC system for chiral separation of NBD-amino acids

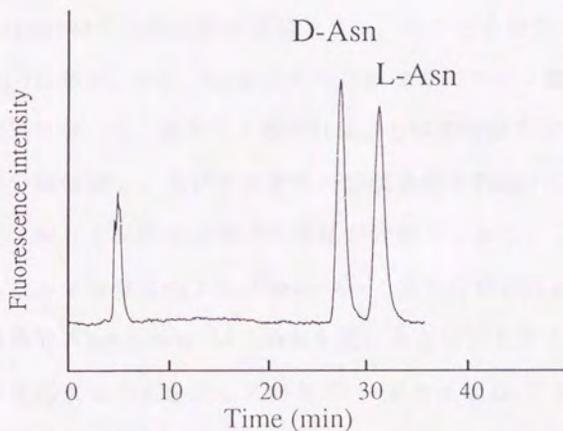


Fig.4 Chiral separation of NBD-D,L-asparagine

Column: Sumichiral OA-2500S, ambient ; precolumn ODS-80T<sub>M</sub>  
 Mobile phase (flow rate): 10mM citric acid / MeOH (1ml/min)  
 Detection: fluorometry ex. 470nm, em. 530nm

ラル認識部位 (Fig.5 a) の修飾率はかなり低く、固定相表面にはアミノプロピル基 (Fig.5 b) が多数残存している可能性が高いとの回答であった。本方法では移動相にクエン酸メタノール溶液を用いているため、この条件下ではアミノプロピル基は完全に正電荷を持つと考えられ、本カラムが陰イオン交換性を持つことが強く示唆された。そこで移動相中のクエン酸濃度を減少させることにより移動相の溶出力を低下させ、His、Argの光学分割を試みた。

その結果Fig.6に示すようにHis、Arg共にクエン酸濃度の減少と共に保持が強くなり、Hisは0.5mMクエン酸メタノール溶液で、Argは同じく0.05mMで光学分割が達成された。そのときのクロマトグラムをFig.7に示す。His、Argを含めてこれまでにアミノ酸を光学分割した結果について、各アミノ酸のD体、L体の保持を示すK'値、D、L体の分離係数 $\alpha$ 、及びそれぞれの分離条件をTable1にまとめた。各アミノ酸とも良好な $\alpha$ 値で対掌体が分離しており、これにより対象とした17種全てのアミノ酸について光学分割が達成された。なお、福島等はSumichiral OA-2500Rを用いるとD、Lアミノ酸の溶出順序が反転することを示しており<sup>2.5)</sup>、本方法はD-アミノ酸の確認にも有効であると考えられる。

### 2-3 生体試料中の微量D-アミノ酸分析法の確立

次に生体試料中から個々のD-アミノ酸の定量を試みた。これに

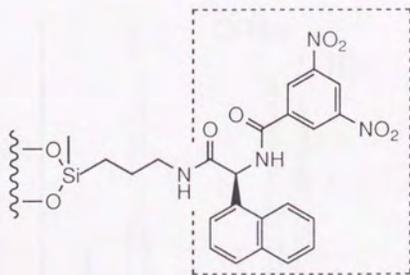


Fig.5 a

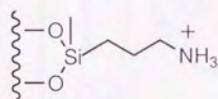


Fig.5 b

Fig.5 Structure of Sumichiral OA-2500(S)

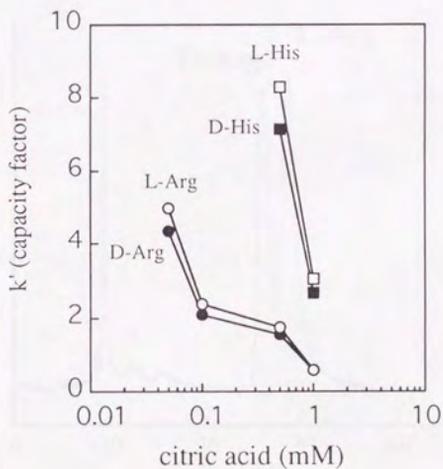


Fig.6 Effect of citric acid on  $k'$  of NBD-D,L-Arg and -His

HPLC conditions

Column: Sumichiral OA-2500(S), ambient

Mobile phase (flow rate): 0.05mM-1mM citric acid / MeOH (1ml/min)

Detection: fluorometry ex. 470nm, em. 530nm

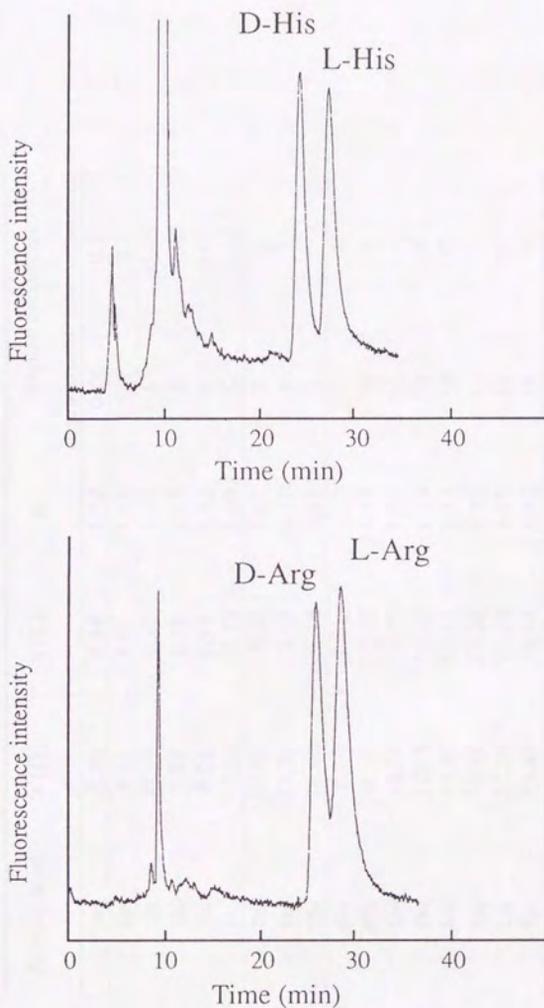


Fig.7 Chiral separation of NBD-D,L-His and -Arg

Column: Sumichiral OA-2500S, ambient ; precolumn ODS-80TM

Mobile phase (flow rate): 0.5mM or 0.05mM citric acid / MeOH (0.5ml/min)

Detection: fluorometry ex. 470nm, em. 530nm

Table 1 Capacity factors ( $k'$ ) and separation factors ( $\alpha$ ) of NBD-D,L-amino acids

Amino acid	$k'(D)$	$k'(L)$	$\alpha$	Elution conditions	
				citric acid (mM)	flow rate (ml/min)
Arg	3.95	4.44	1.12	0.05	0.5
His	4.31	4.97	1.15	0.5	0.5
Leu	6.39	7.10	1.11	5	0.65
Ile	7.82	8.78	1.12	5	0.65
Val	8.08	9.10	1.13	5	0.65
Pro	16.98	15.79	1.08	5	0.65
Thr	10.03	11.28	1.12	5	1
Ser	13.90	15.57	1.12	5	1
Glu	18.08	20.14	1.11	5	1
Ala	7.14	7.89	1.10	10	1
Met	9.18	10.58	1.15	10	1
Gln	10.07	10.79	1.07	10	1
Phe	10.19	12.03	1.18	10	1
Asn	10.80	12.12	1.12	10	1
Asp	19.46	21.32	1.10	10	1
Lys	23.86	27.38	1.15	10	1
Tyr	24.42	28.44	1.16	10	1

HPLC conditions

Column : Sumichiral OA-2500(S), ambient

Mobile phase (flow rate) : 0.05mM - 10mM citric acid / MeOH (0.5ml - 1.0ml/min)

Detection : fluorometry ex. 470nm, em. 530nm

はこれまで分離が不完全であった異種アミノ酸間の分離と、生体由来の微量夾雑物を除去する必要がある。福島等の方法ではFig.8に示すように生体試料からメタノールで除タンパクを行った後、得られた上清を減圧乾固させ、NBD化した後、直接Sumichiral OA-2500SによりD-アミノ酸分析を行っていた。筆者もこの方法を追試し、まず異種アミノ酸間の分離を改善することにより、対象とした17種全てのD-アミノ酸の分析を試みた。しかし、Sumichiral OA-2500SはキラルカラムでありODSカラム等と比較すると理論段が低く、現実的に17種のアミノ酸のD、L体及びグリシン等の40種近い化合物を一斉分析するのは非常に困難であった。また、実際の生体試料中ではD-アミノ酸は非常に微量な成分であり、Sumichiral OA-2500Sによる分離のみでは多種多様な生体由来の夾雑物の影響を完全に除くことは難しいと考えた。

微量成分であるD-アミノ酸と比較し、L-アミノ酸は生体内で比較的多量に存在し、NBDで標識される化合物のなかにはL-アミノ酸と同程度に検出される夾雑物はほとんど存在しない。このためキラル固定相を用いてD-アミノ酸を単独で定量するよりも、逆相カラムなどを用いて各アミノ酸をD、L混合物として定量する方が正確に定量できると考えた。またこの段階で同時に異種アミノ酸間の分離を行えば、対象とする全てのD-アミノ酸について微量分析が可能になると考えられた。そこで筆者はFig.9に示した方法を考案し、検討を行った。

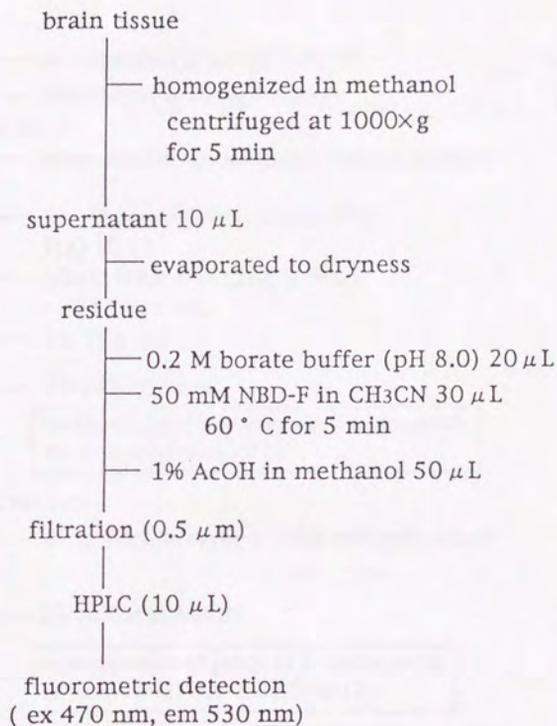


Fig.8 *Analytical procedure described by Fukushima et al.* <sup>25)</sup>

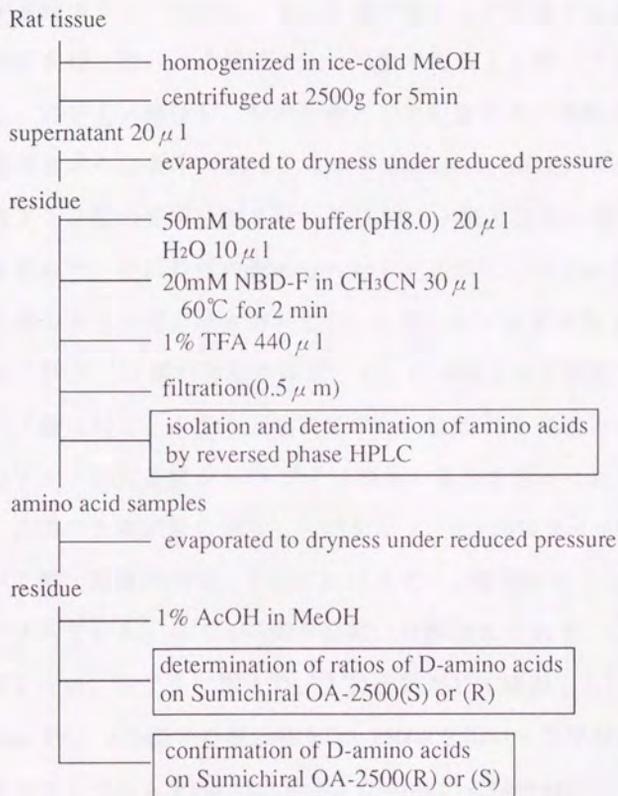


Fig. 9 Analytical procedure of *D,L*-amino acids in biological samples

まずSumichiral OA-2500による光学分割に先立って各NBDアミノ酸を逆相カラムで分離し、D, L混合物として定量すると同時に分取精製を行った。この段階で分析対象である17種のアミノ酸を分離し、各アミノ酸はD, L混合物として定量され、精製される。次に先ほど求めた条件(2-2)によりSumichiral OA-2500S or Rを用いて各アミノ酸の光学分割を行い、D-アミノ酸の存在を調べ、D/L比を求めた。更にD体の認められたアミノ酸については逆の立体配置を持つキラル固定相を用いてD, L体のピークが反転するのを確かめ、D-アミノ酸の存在を確認した。この様にして確認されたD-アミノ酸に対し、キラル固定相で求めたD/L比と逆相カラムで求めたアミノ酸定量値からD-アミノ酸量の算出を行った。

実際の生体試料に適用した例を示す。Fig.10はラット松果体について第一段階のODSカラムにおけるアミノ酸分析を行ったクロマトグラムである。各アミノ酸が良好に分離されており、この段階で分取を行い、各アミノ酸をD, L混合物として精製した。このうち、Ala、Pro、Asp画分の混合物をOA-2500Rを用いて光学分割を行ったクロマトグラムをFig.11に示す。この様に光学分割については、互いに重ならないことが分かっているアミノ酸は同時に分析することも可能である。その結果Fig.11に示すようにAla、ProについてはD体が認められなかったが、AspにはD体が認められた。そこで次にこのAspについて逆の立体配置を持つOA-2500Sを用いてD, L体のピークが反転することを確認し、D-Aspの存在を確認した (Fig.12)。

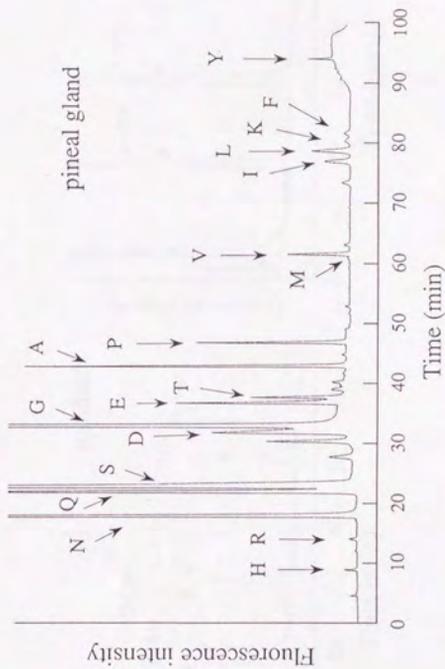


Fig.10

*Separation of amino acids by reversed phase HPLC*

Column : J'sphere ODS-M80, 35°C  
 Precolumn : ODS-80Ts  
 Mobile phase : A, 1%THF 0.02% TFA / 10%CH<sub>3</sub>CN  
 B, 1%THF 0.02% TFA / CH<sub>3</sub>CN  
 Gradient : time(min), 0 18 50 83 90  
 A% ,100 100 75 75 25

Flow rate : 1ml/min  
 Detection : fluorometry  
 ex. 470nm, em. 540nm

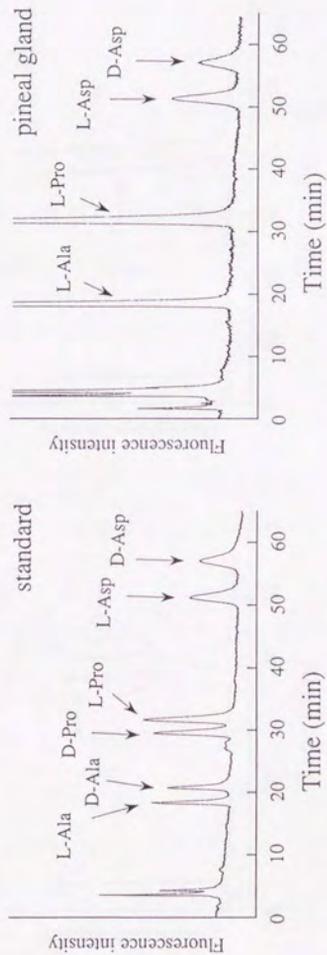


Fig.11

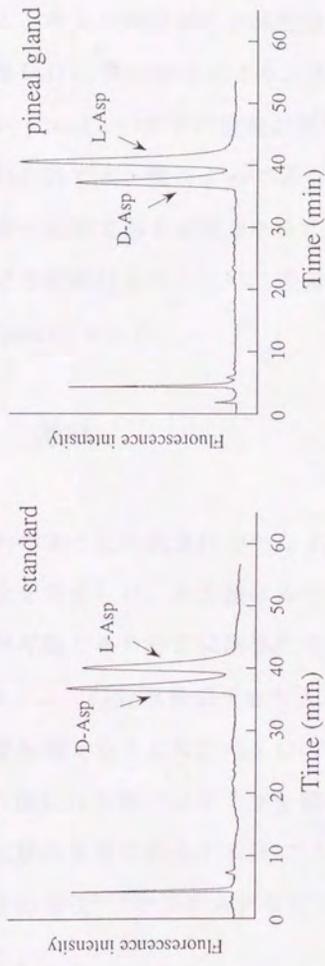
*Determination of ratios of D-amino acids in rat pineal gland*

Column : Sumichiral OA-2500(R), ambient

Precolumn ; ODS-80T<sup>™</sup>

Mobile phase (flow rate) ; 5 mM citric acid / MeOH (1ml/min)

Detection ; fluorometry ex. 470nm, em. 530nm



**Fig.12**  
*Confirmation of D-amino acid in rat pineal gland*

Column ; Sumichiral OA-2500(S), ambient  
 Precolumn ; ODS-80T<sub>M</sub>  
 Mobile phase (flow rate) ; 10 mM citric acid / MeOH (1ml/min)  
 Detection ; fluorometry ex. 470nm, em. 530nm

以上述べてきたようにODSカラムを用いた各アミノ酸の定量及び精製と、キラル固定相の立体配置の逆転を利用したD-アミノ酸の確認及びD/L比の決定により、生体試料中の17種のD-アミノ酸についてfmolレベルでの定量が可能となった。

なお、各アミノ酸によって異なるが、今回使用したシステムにおいて第一段階である逆相カラムにおける検量線は50fmolから5pmolで良好な直線性を示し、第二段階のキラル固定相においては1fmolから1pmolであった。

#### 2-4 考察

以上のように生体試料中から17種のD-アミノ酸について微量分析法を確立した。本方法は各D-アミノ酸についてfmolレベルでの定量が可能であり非常に高感度であると考えられる。また本方法はODSカラムでの分取精製を取り入れており、生体由来の微量夾雑物の影響を抑えると共に正確なD-アミノ酸定量を可能とした。しかし操作的には多数のステップを踏むことにより簡便性は失われており、比較的少量に存在するD-アミノ酸を定量する場合には従来の福島等の方法<sup>20)</sup>やジアステレオマー法<sup>21)</sup>で対応可能であると考えられる。

この様に本方法は特に生体中の微量D-アミノ酸の定量、及び総合的に全てのD-アミノ酸を分析するときには有効であると考えられ

る。また本研究では17種のD-アミノ酸を対象としたが、今回対象としなかったTrp、Cysに適用範囲を拡大することは今後の課題である。Trpは電気化学的にインドール環を開環させることにより、NBD化を用いた蛍光検出が可能であることが報告されており<sup>26)</sup>、Cysに関してもNBD化条件を最適化することで定量は可能になると考えられる。この2種のアミノ酸を含め生体中で重要な20種のアミノ酸が分析可能になれば、さらに研究が広がると考えられ今後の検討が期待される。

### 第三章 ラット脳内におけるD-アミノ酸の分布

#### 3-1 序

近年ラット脳内においてD-Ser、D-Asp等のD-アミノ酸の存在が明らかになり、D-アミノ酸の脳内における働きに興味を持たれている。ラット脳内において、D-Serは主に大脳に存在しNMDAレセプターのグリシンサイトに対する内在性リガンドではないかと考えられている<sup>1,3),15)</sup>。また、D-Aspは新生時には大脳、小脳など脳内の広い範囲にわたって存在するが、その濃度は急速に減少し、6から7週齢までにほとんど存在しなくなることが明らかになっている<sup>1,2)</sup>。この他、全脳を用いてD-Glu<sup>1,9)</sup>、D-Ala<sup>2,7)</sup>が存在したとする報告もあり、当研究室においても福島等が成熟ラット(6週齢)の松果体にD/L比にして50%以上の多量のD-Aspが存在することを示している<sup>2,8)</sup>。

この様に近年ラット脳組織から次々とD-アミノ酸の存在が示されてきた。しかし全脳による検討のみで細かい存在部位が明らかになっていない報告もあり、更に新規のD-アミノ酸が発見される可能性も考えられる。そこで本研究において確立した分析法を用い、ラット脳内に存在するD-アミノ酸の種類及びその分布を調べた。

#### 3-2 ラット脳内におけるD-アミノ酸の分布

S D系6週齢の雄性及び雌性ラットを、エーテル麻醉下で腹部大動脈から脱血致死させた後、脳組織を取り出し、松果体、大脳、小脳、海馬、下垂体、延髄、視床下部に分画した。次に各脳部位についてD-アミノ酸分析を行った。なお、今回分画しなかった中脳、橋等の部位については大脳と共に分画し、重量的には殆ど大脳がしめることから今回は大脳として扱った。

本方法を用いたD-アミノ酸分析により、ラット脳内からAsp、Ser、Ala、LeuのD体が認められた。D-Aspの分布をFig.13に示す。かっこ内の数字はD体のパーセンテージを示し、性差の認められたものについては星印を記した。この様にラット脳内においてD-Aspは下垂体にわずかに存在するものの、松果体に局在しており、その%Dは30から40%であった。

D-Serの分布をFig.14に示す。この様にD-Serはラット脳内に広く分布し、特に大脳、海馬、視床下部では多量に存在した。その%Dは10から30%であった。また、松果体、下垂体にもわずかに存在したが、小脳、延髄では認められなかった。以上に示したD-AspとD-Serは比較的含量も多く、これまでもいくつかの報告があった。しかし次に示すD-AlaとD-Leuについては非常に微量な成分であり、これまでにラット脳中で存在したとする報告はほとんど無い。

Fig.15にD-Alaの分布を示す。ここに示したようにラット脳内においてD-Alaは下垂体に存在し、他の部位には認められなかった。ま

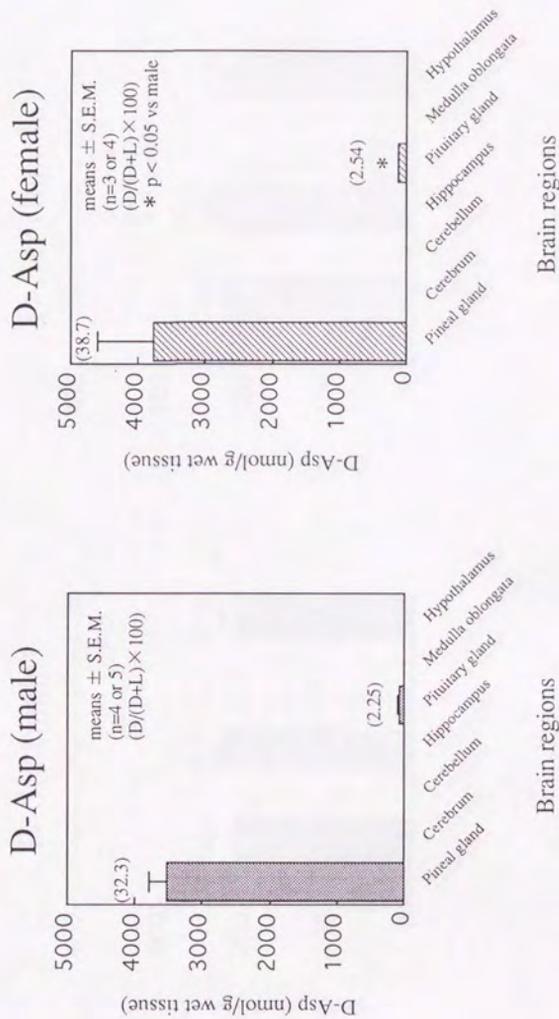


Fig.13 D-Asp contents in various regions of rat brain

(rat : Sprague - Dawley, 6 weeks of age)

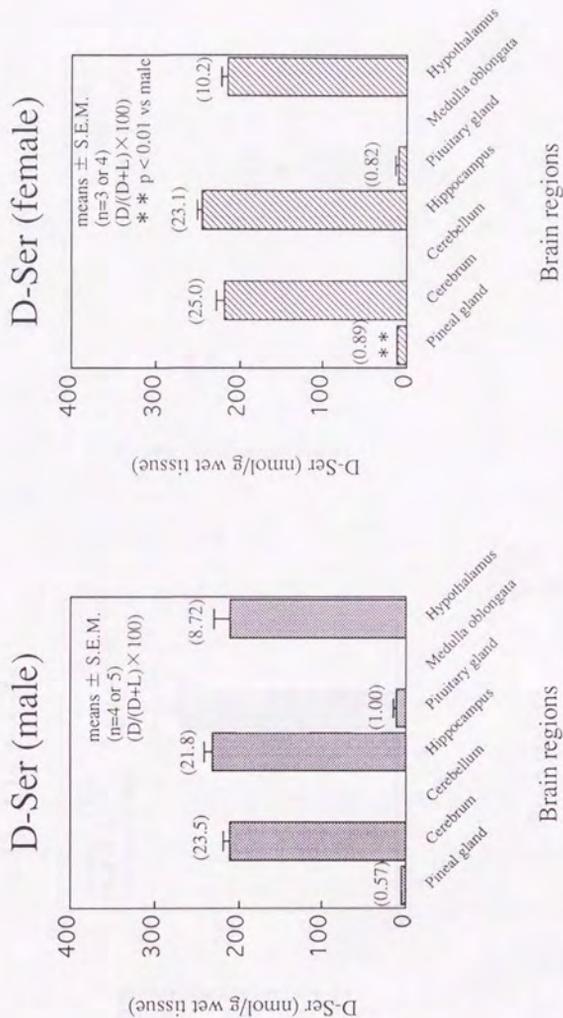
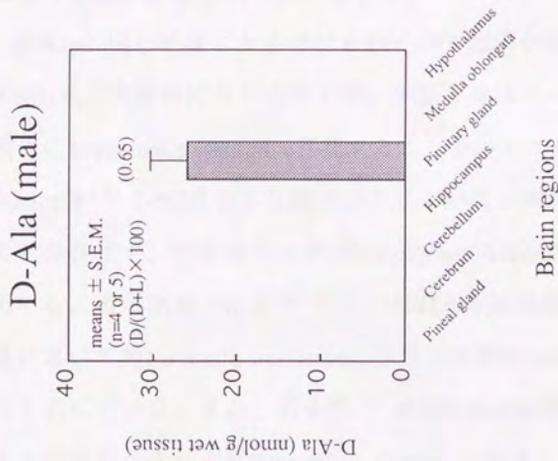
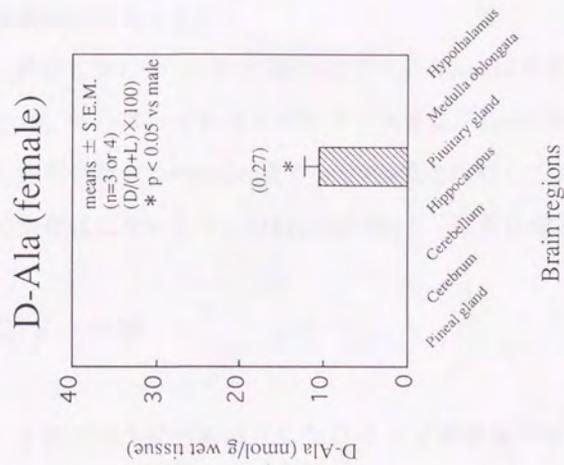


Fig.14 D-Ser contents in various regions of rat brain

(rat : Sprague - Dawley, 6 weeks of age)



**Fig.15 D-Ala contents in various regions of rat brain**

( rat : Sprague - Dawley, 6 weeks of age)

た、その% Dは雄性で0.65%、雌性で0.27%と低く、非常に微量成分であった。

最後にD-Leuの分布をFig.16に示す。D-Leuは松果体、海馬で認められ、% Dはいずれも1%以下であった。Leuに関しては、D体とL体を合わせたtotal Leu量がtotal Ala量と比較して約10分の一程度しか存在しないため、D-LeuはD-Alaよりも更に微量成分であった。

### 3-3 考察

上記のように今回確立したD-アミノ酸微量分析法を用い、ラット脳内からD-Asp、D-Ser、D-Ala、D-Leuが検出され、6週齢ラットにおける脳内分布が明らかになった。

D-Aspに関してはこれまでもいくつか報告があり、橋本等<sup>12)</sup>はWistar系7週齢雄性ラットの大脳、小脳ではほとんど存在せず、下垂体に約90nmol/g wet tissue存在することを示している。また、Dunlop等<sup>29)</sup>もSD系55日齢ラットにおいて、大脳、小脳ではほとんど存在せず、下垂体では約130nmol/g wet tissueであることを示している。当研究室の福島等<sup>25) 28)</sup>はSD系6週齢雄性ラットの松果体において約1 $\mu$ mol/g wet tissue、下垂体に約50nmol/g wet tissueの存在を示している。また、解良等<sup>19)</sup>及びD'Aniello等<sup>27)</sup>は7週齢ラットの全脳からそれぞれ20nmol/g、40nmol/gのD-Aspを検出している。本研究ではSD系、6週齢ラットを用い、松果体におけるD-Asp含量

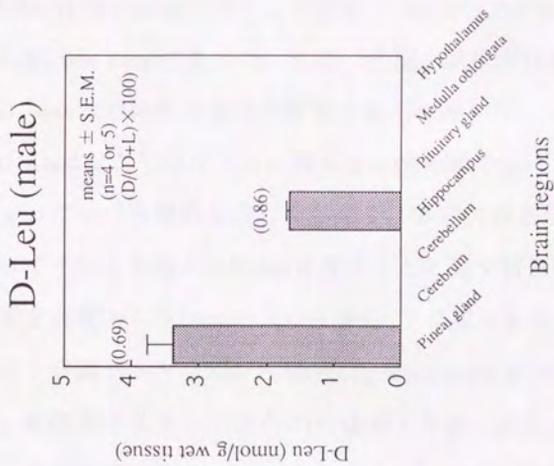
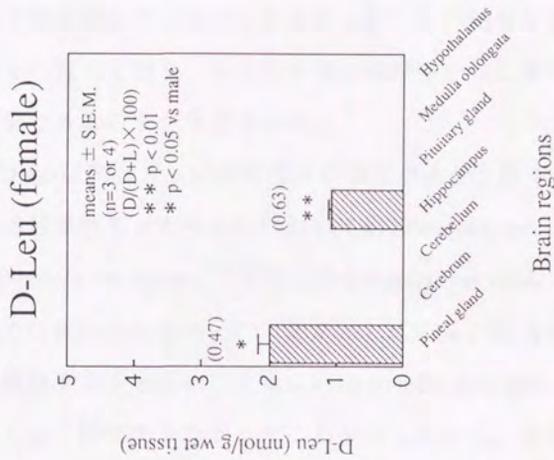


Fig.16 D-Leu contents in various regions of rat brain

(rat : Sprague - Dawley, 6 weeks of age)

は約  $3 \mu\text{mol/g}$  wet tissue、下垂体では約  $100\text{nmol/g}$  wet tissue であり、その他の部位では認められなかった。この結果は従来までの報告とよく一致しており、本方法が生体試料中から正確に D-アミノ酸を測定できることが確認された。

D-Ser に関しても同様に種々の報告があり、橋本等<sup>1,2)</sup> は Wistar 系 7 週齢雄性ラットの大脳において約  $200\text{nmol/g}$  wet tissue、海馬に約  $200\text{nmol/g}$  wet tissue、下垂体で約  $20\text{nmol/g}$  wet tissue であり、延髄、小脳では検出されなかったことを示している。福島等<sup>2,5)</sup> も SD 系 7 週齢雄性ラットを用いて大脳に約  $100\text{nmol/g}$  wet tissue、また小脳ではほとんど検出できなかったことを示している。本研究においては SD 系 6 週齢ラットを用い、大脳、海馬、視床下部でそれぞれ約  $200\text{nmol/g}$  wet tissue であり、下垂体で  $10\text{nmol/g}$  wet tissue、松果体で  $5\text{nmol/g}$  wet tissue であった。また、小脳、延髄では認められなかった。これらの結果も従来の報告と良く一致した。

D-Ala に関してはラットに限らず、哺乳類の脳内で存在が明らかになったという報告もほとんど無く、筆者の知る限り D'Aniello 等によってラット全脳から D-Ala を検出したと言う報告<sup>2,7)</sup> と、ヒトの灰白質と白質から検出したという報告<sup>1,7)</sup> に限られている。D'Aniello 等は 7 週齢ラット全脳から  $60\text{nmol/g}$  wet tissue の D-Ala を検出している。本研究ではラット脳内の D-Ala が下垂体に局在することが示され、その含量は約  $20\text{nmol/g}$  wet tissue であった。下垂体は  $5\text{mg}$  程度の組織であり、ラット全脳が約  $1.5\text{g}$  とすると D'Aniello 等の報告は

非常に多量のD-Alaを含んでいる結果になる。彼らは同論文でラット全脳のD-Aspについても報告しているが、こちらも前述の橋本等、福島等、Dunlop等及び本研究での定量値をはるかに上回る含量であるため、ラットの飼育環境（SPF, Germ-free等）、食餌等が他の報告とかなり異なっていたのではないかと考えられる。

D-Leuに関しては、これまでにラット脳内で認められたという報告は筆者の知る限り存在しない。本研究において松果体及び海馬にD-Leuが存在することが示された。3-2でも述べたようにD-Leuは超微量成分であり、約3nmol/g wet tissueである。松果体は1mg程度の重量しかないため、実際にはfmolレベルのD-Leuを定量することになり、今回確立した微量分析法を用いて初めて定量が可能になったと考えられる。

以上のように本分析法を用いて、生体試料中の微量D-アミノ酸が正確に定量できることが示された。また、性差の認められたD-アミノ酸も存在した。以上述べてきた結果は、特定の脳部位に特定のD-アミノ酸が性依存的に存在することを示している。特定の脳部位に特定のD-アミノ酸が存在することは、その存在部位において該当するD-アミノ酸が何らかの働きを持つことを示唆すると考えられる。また性差に関しては、肝臓と腎臓においてD-アスパラギン酸オキシダーゼ活性に性差があることが示されている<sup>19)</sup>が、脳各部位における酵素活性など性差を説明する事実は現段階においてはほとんど無く、今後の課題であると考えられる。

## 第四章 ラット脳内D-アミノ酸の週齢変化

### 4-1 序

第三章においてラット脳内におけるD-アミノ酸の分布を示した。その結果D-Asp、D-Ser、D-Ala、D-Leuが存在することが明らかになった。部位別に考えると松果体や下垂体に特に多種のD-アミノ酸が存在した。そこでこれらの部位について、D-アミノ酸の機能を調べるための基礎検討として加齢に伴う各アミノ酸の含量変化を調べた。

### 4-2 ラット脳内D-アミノ酸の週齢変化

D-アミノ酸含量が成長の過程でどの様に変化するかを調べることは、その生体内での機能を知る上で重要であると考えられる。本研究では松果体のD-Asp、D-Ser及びD-Leu含量と、下垂体のD-Ala含量について週齢変化を調べた。ラットはSD系雄性を用い、2週齢から36週齢まで検討した。

Fig.17に松果体におけるD-Asp含量の週齢変化を示す。比較のため、L体の推移も並記した。D、L体とも星印は2週齢と比較して有意な変化が認められたものを示し、かっこ内の数字はD体のパーセンテージを示す。この様に松果体D-Aspは生後2週齢においてはほと

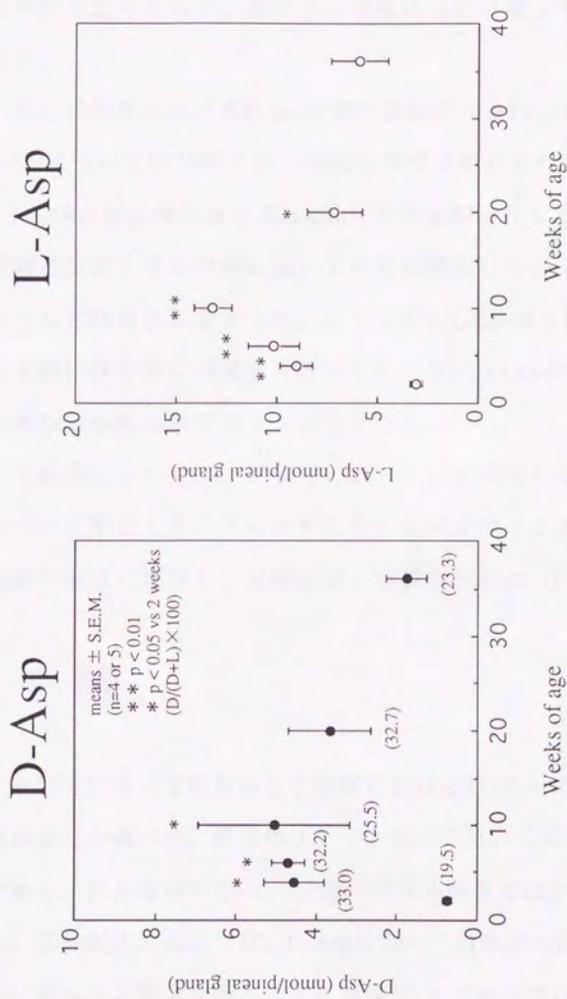


Fig.17 Developmental changes of D,L-Asp contents in rat pineal gland

( rat : Sprague - Dawley, male)

んど存在せず、4週齢から10週齢において2週齢と比較して有意な増加が認められた。更に20週齢以後には減少する傾向が認められた。

次に松果体におけるD-Ser含量の週齢変化をFig.18に示す。松果体D-Serについては加齢に伴う有意な変化は認められなかった。

Fig.19に松果体におけるD-Leu含量の週齢変化を示す。D-Leuは2週齢と比較して6週齢において有意に増加した。また20週以降はほとんど検出されなかった。これに対しL-Leuは2週齢と比較し、6週齢以後有意に高濃度を維持しており、D-Leuが明らかにL体とは異なる挙動を示すことが示された。

下垂体については、本研究において存在が明らかになったD-Alaについて検討した。その結果生後2週齢ではほとんど存在せず、4週齢で有意に増加し、以降ほぼ一定値を示した (Fig.20)。

#### 4-3 考察

本研究において松果体と下垂体におけるD-アミノ酸含量について週齢変化を調べた。松果体はラット脳内において非常に小さい組織であり、松果体中のD-アミノ酸に関する報告はほとんど存在しない。週齢変化に関しては、D-Aspについて当教室の福島等が6週齢以降に減少する傾向があることを報告<sup>28)</sup>しているのみである。D-Asp含量については今回更に幼若期を加え2週齢から36週齢まで

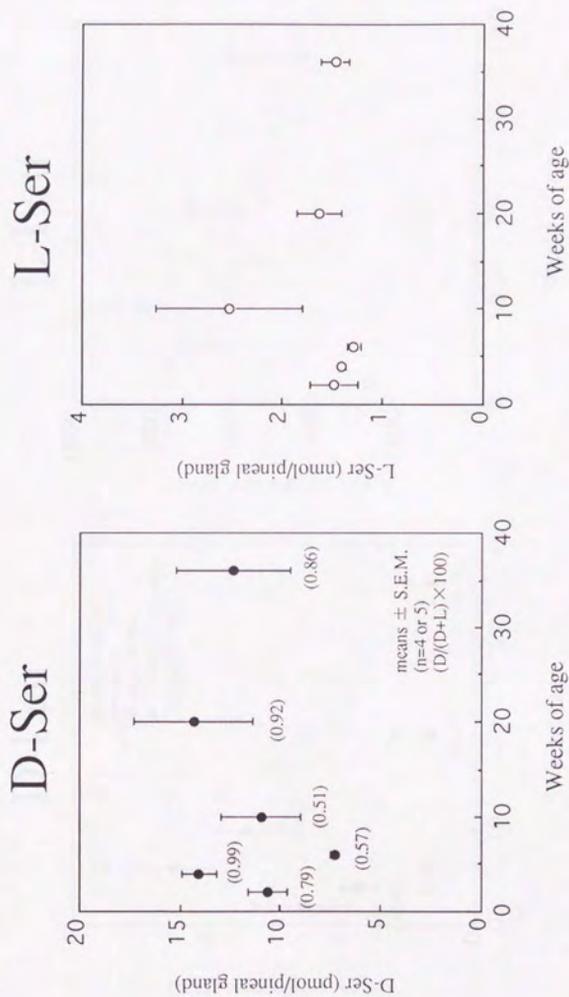


Fig.18 Developmental changes of D,L-Ser contents in rat pineal gland  
( rat : Sprague - Dawley, male)

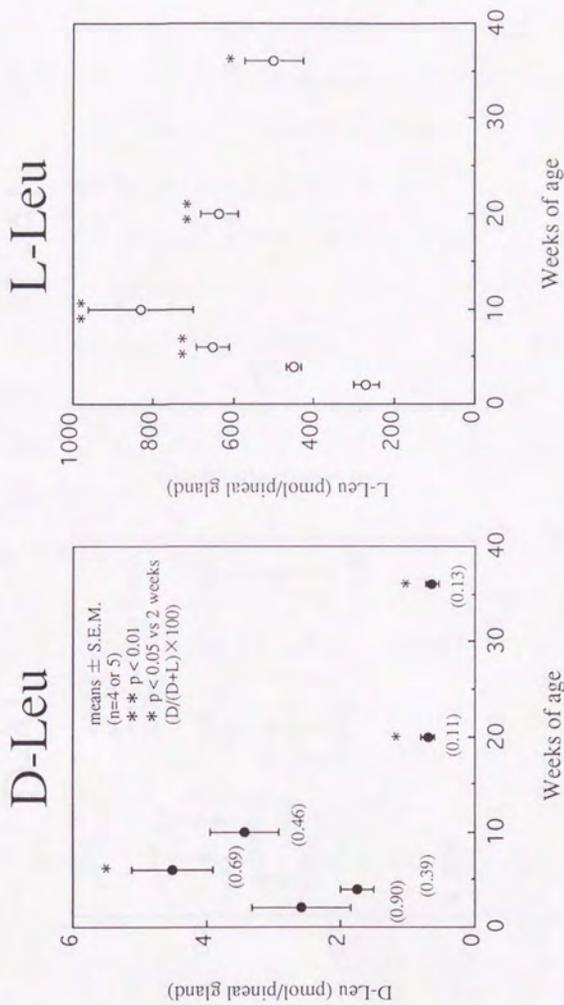


Fig.19 Developmental changes of D,L-Leu contents in rat pineal gland

(rat : Sprague - Dawley, male)

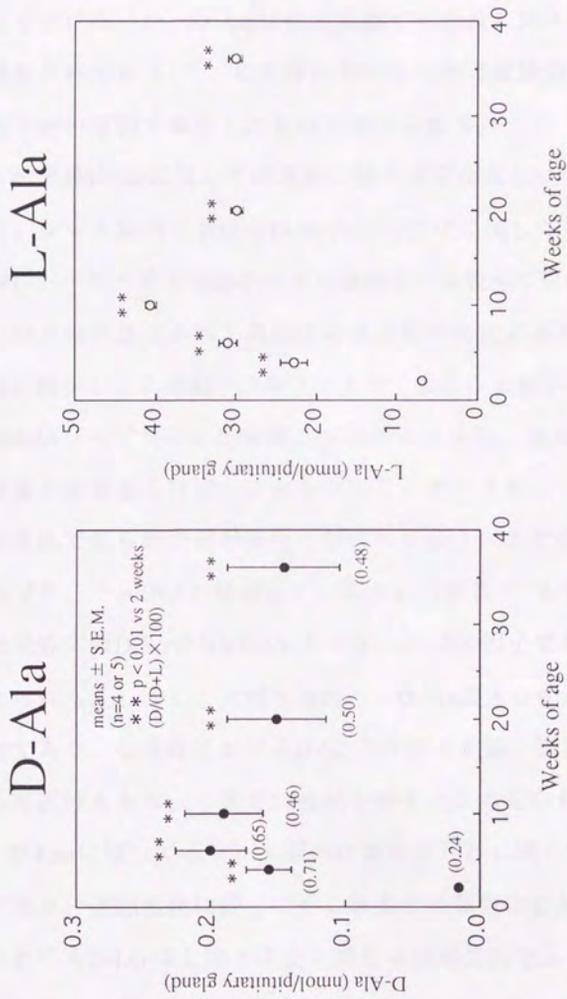


Fig.20 Developmental changes of D,L-Ala contents in rat pituitary gland  
(rat : Sprague - Dawley, male)

を検討し、4週齢から10週齢にかけて一過性の増加を示すことが明らかになった。D-Aspは他の組織でも成長に伴う一過性の上昇が報告されており<sup>1,2)</sup>、松果体においてもその成長の一時期において何らかの原因で増加したものと考えられる。

松果体D-Serに関しては週齢に伴う有意な変化は認められなかった。ラット脳内におけるD-Serの週齢変化に関しては橋本等<sup>1,2)</sup>が大脳において生後0週齢から86週齢まで高濃度で存在し続けること、小脳では生後0から1週齢には高濃度で存在するが、3週齢以後急速に減少し、7週齢では検出できなくなることを示している。また、NMDAレセプターとの相関が認められる大脳、海馬などではD-Ser含量が成長後もほぼ一定値をとることが示されている。これは今回松果体で見られた週齢変化と類似しており、また松果体にNMDAレセプターのmRNAが発現しているという報告<sup>3,4)</sup>もあることから、松果体内のD-SerがNMDAレセプターの調節因子である可能性も考えられる。しかし、大脳や海馬でのD-Ser濃度は松果体中の約50倍であり、松果体におけるD-Serの役割は大脳、海馬などとは異なる可能性もあり、今後更に検討を要すると考えられる。

D-Leuに関してはラット脳内における存在に関しても新規の発見であり、週齢変化に関してもこれまでの報告は皆無である。松果体におけるD-LeuはL体とは全く異なる週齢変化を示し、D-アミノ酸がL体とは異なる調節機構を有することを示唆した。

また下垂体においては、D-Alaが2週齢ではほとんど存在せず、

4 週齢で増加した後、ほぼ一定値を示した。

以上のように各D-アミノ酸はそれぞれ独特の週齢変化を示すことが明らかになった。これらの結果はD-アミノ酸含量が各脳部位において、それぞれのアミノ酸特有の調節を受けていることを示すと考えられる。

## 第五章 ラット松果体中D-Asp及びD-Leuの 種々の薬物投与時における含量変化

### 5-1 序

第四章において松果体のD-Asp、D-Leu含量が興味深い週齢変化を示すことが明らかになった。そこでこの松果体におけるD-AspとD-Leuに関して、松果体機能を変化させる薬物を投与することにより、その含量変化を調べた。また、この検討の過程で各D-アミノ酸含量が麻酔薬によって変化することが明らかになったので種々の麻酔薬による含量変化についても検討した。

### 5-2 $\beta$ アゴニスト投与による松果体中D-Asp、D-Leuの 含量変化

ラットの松果体はFig.21に示したような経路<sup>31)</sup>により、夜間に $\beta$ 受容体を介して松果体ホルモンであるメラトニンを合成、分泌することが知られている。網膜からの光情報は視交叉上核、視床下部、胸髄の中間外側核、上頸神経節を経て最終的に交感神経を介して松果体に到達する。この交感神経は光情報と、視交叉上核内の体内時計の支配を受け、通常は夜間に限ってノルエピネフリンを放出する。これが松果体の $\beta_1$ 受容体を刺激し、アデニレートシクラーゼの活

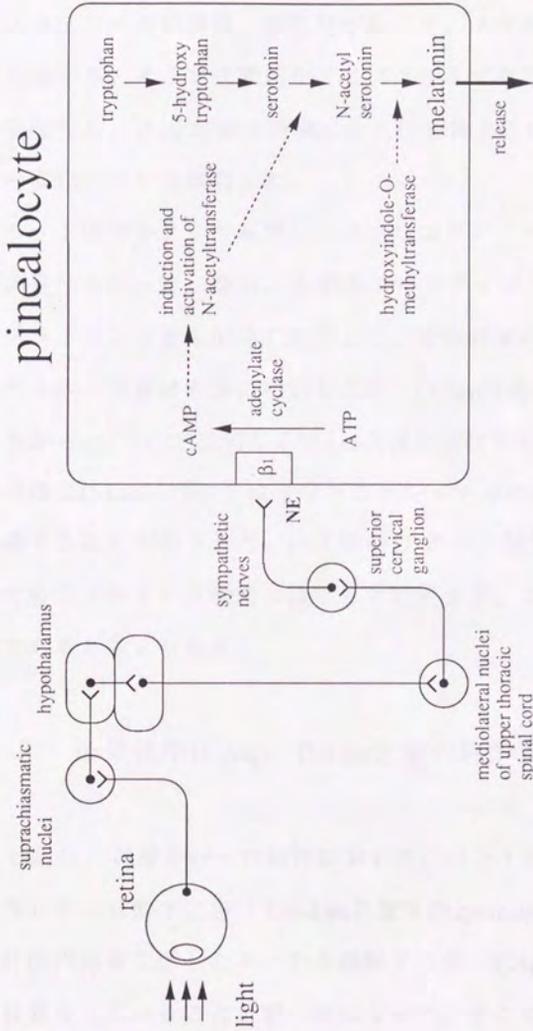


Fig.21  $\beta$  -Adrenergic stimulation of melatonin release in rat pineal gland

性化を介してメラトニン合成経路の律速酵素であるN-アセチルトランスフェラーゼの誘導、活性化が起こり、メラトニンの合成、分泌が亢進する。そこで代表的な $\beta$ アゴニストであるイソプロテレノールを投与し、 $\beta_1$ 受容体の刺激による松果体中のD-Asp及びD-Leu含量の変化について検討した。

ラットはウレタンで麻酔し、イソプロテレノールは5 mg/kgで腹腔内投与を行った。なお、 $\beta_1$ 刺激のポジティブコントロールとしてメラトニン含量も同時に測定した。その結果Fig.22に示すようにメラトニン含量は有意に増加したが、D-Asp含量には変化が認められなかった。Fig.23は同じくD-Leu含量の変化を示したものである。この様にD-Leuについてはイソプロテレノールの投与により有意に上昇することが示された。内在性のD-アミノ酸量が薬物投与によって変化するという報告はほとんど存在せず、この結果は重要な発見であると考えられる。

### 5-3 松果体中D-Asp、D-Leu含量の麻酔薬による変化

上記の $\beta_1$ 刺激を行った検討において、コントロールとして用いたウレタン麻酔下におけるD-Leu含量は約2pmol/pineal glandであり、先に脳内分布で示したエーテル麻酔下の値(約4pmol/pineal gland)とは異なっていることが明らかになった。そこで各種麻酔薬投与時における松果体中のD-Asp、D-Leu含量について詳細に検討した。

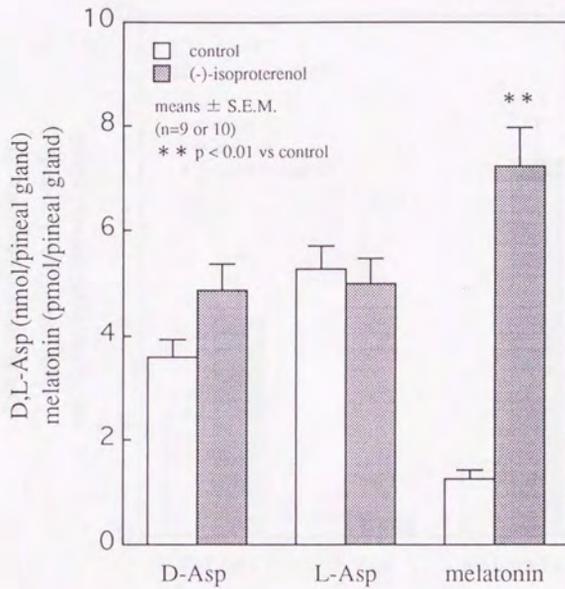


Fig.22

*Effect of (-)-isoproterenol on D,L-Asp and melatonin contents in rat pineal gland*

(rat : Sprague - Dawley, male, 6 weeks of age)

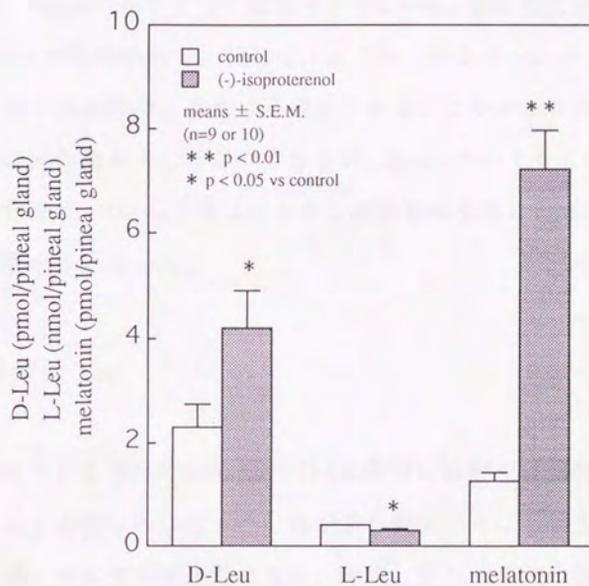


Fig.23

*Effect of (-)-isoproterenol on D,L-Leu and melatonin contents in rat pineal gland*

( rat : Sprague - Dawley, male, 6 weeks of age)

麻酔薬としては我々が汎用しているエーテル、ウレタン、ペントバルビタールを用い、比較のため無麻酔時の含量も同時に検討した。その結果、Fig.24に示すように松果体中のL-Asp含量は変化せず、D-Asp含量のみが無麻酔時と比較してエーテル、ウレタン、ペントバルビタールの各麻酔時に有意に高濃度であることが示された。Fig.25はD-Leu含量を示したものであるが、LeuについてもL体はほとんど変化せず、D-Leu含量はウレタン麻酔時に有意に低濃度になることが明らかになった。

#### 5-4 考察

上記のように松果体中D-Asp及びD-Leu含量は麻酔や $\beta$ 刺激により変化することが明らかになった。時間的な側面からは週齢変化のように日、週レベルでの変化ではなく、時間、分レベルでの変化が認められた。この事実は、松果体内におけるD-アミノ酸含量の変動が外来性の受動的なものではなく、生体内において積極的な調節機構が存在することを示唆すると考えられる。前述のように内在性のD-アミノ酸含量が薬物の投与などにより変化したという報告は筆者の知る限りほとんど存在せず、今回の結果は重要な発見であると考えられる。

麻酔薬に関しては、麻酔時において各組織の交感神経活性が変化<sup>32)</sup>し、これと共に血中のカテコールアミン量が増加することが報

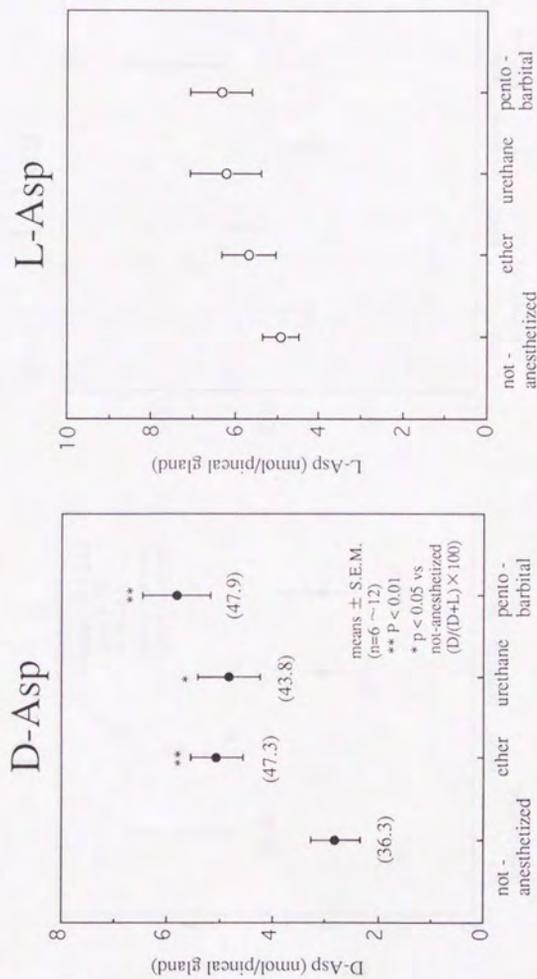


Fig.24 Effect of anesthesia on D,L-Asp contents in rat pineal gland  
(rat : Sprague - Dawley, male, 6 weeks of age)

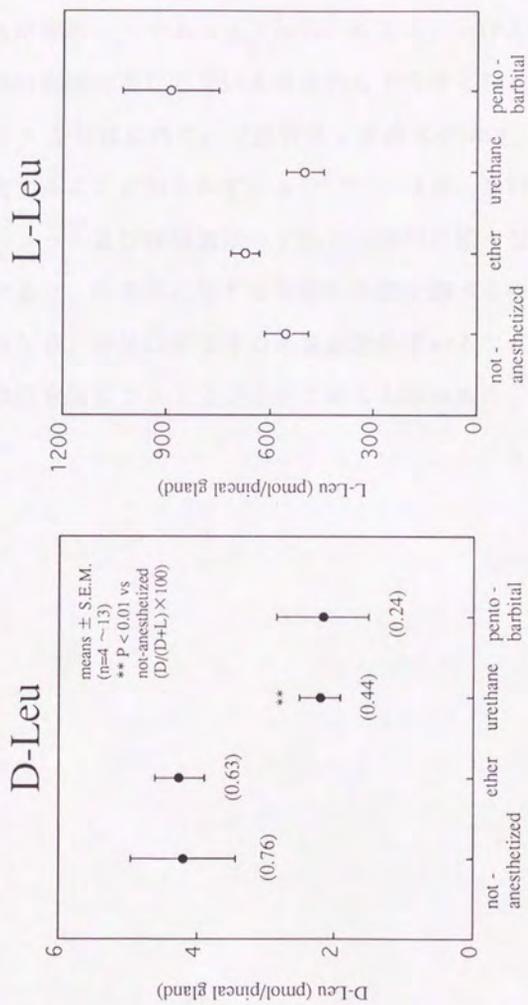


Fig.25 Effect of anesthesia on D,L-Leu contents in rat pineal gland

(rat : Sprague - Dawley, male, 6 weeks of age)

告されている<sup>32) 33) 34)</sup>。今回使用したイソプロテレノールは交感神経作用薬の一つであることから、松果体におけるD-Leu含量は交感神経の影響で変化している可能性も十分考えられる。しかし松果体には $\beta_1$ 受容体以外に、交感神経 $\alpha$ 受容体やNPY、VIP等の受容体も存在することが知られている<sup>35) 36)</sup>。また、今回検討したイソプロテレノール及び麻酔薬はいずれも生体内の様々な部位に作用するものであり、松果体に対する直接の影響を調べるのは困難であると考えられる。今後は松果体の培養細胞を用いるなどの方法で薬物の作用部位を限定する工夫が必要であると思われる。

## 第六章 松果体マイクロダイアリシス法を用いた 細胞外D-Asp量の測定

### 6-1 序

前章までの検討において、組織摘出によりそこに含まれるD-アミノ酸量を調べてきた。本研究では生体内D-アミノ酸について異なる側面から検討するため、マイクロダイアリシス法の導入を試みた。マイクロダイアリシス法は近年神経科学の領域で多用されており、注目を集めている。この方法を用いると、同一ラットにおける脳内物質の細胞外濃度をin vivoで経時的に測定することが可能である。しかし採取できるサンプル量が少なく、脳内物質の回収率もそれほど高くないことから、組織摘出時と比較してはるかに微量のD-アミノ酸しか得られないことが予想された。そこでラット脳内において最も高濃度に存在した松果体D-Aspを対象とし、マイクロダイアリシス法によりその細胞外濃度の経時変化を調べた。

### 6-2 松果体マイクロダイアリシス法を用いた細胞外 D-Aspの測定

Fig.26はラット脳内における松果体の位置（脳を上部から見たもの、及び松果体部位における断面図）を示したものである<sup>37)</sup>。

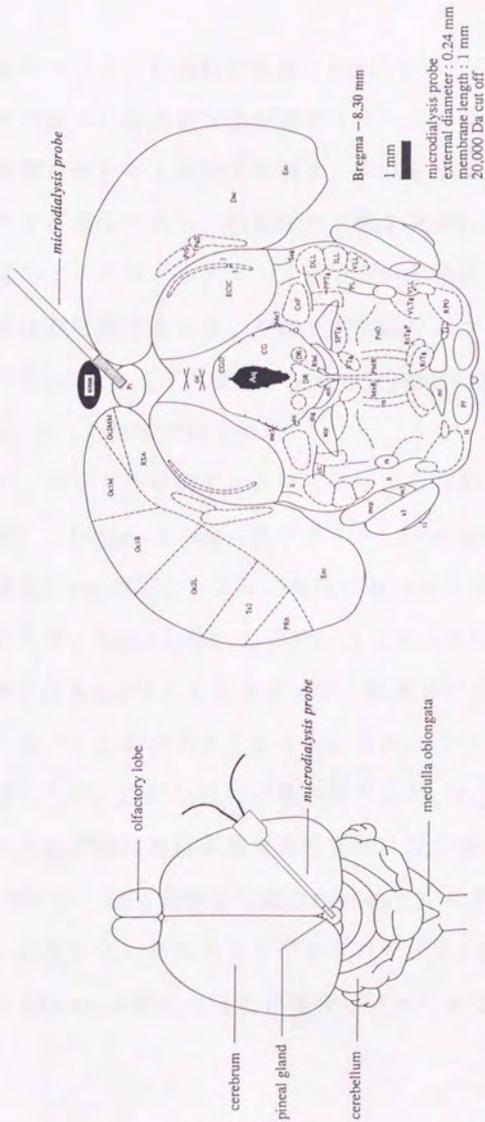


Fig.26 Pineal microdialysis in rat brain

この様にラットの松果体は直径1mmにも満たない球状の組織であり、その直上に静脈洞交会が存在する。この静脈洞交会は左右の大脳半球間を流れる上矢状静脈洞と、大脳と小脳間を流れる横静脈洞の合流する部位であり、松果体の上部を完全に覆っている。このため通常のマイクロダイアリシス法で用いる垂直にプローブを挿入する方法は不可能であった。そこで本方法ではプローブの左右の位置を決めるLM軸と上下の位置を決めるDV軸に45度の傾きを持たせ、Fig.26に示した角度で行った。

まず、ウレタン麻酔下において日中から夜間における変化について検討し、D-Asp、L-Asp、及びメラトニンの経時変化を測定した。その結果、Fig.27に示すように夜間におけるメラトニンの上昇は認められたが、AspはD体、L体共にほとんど変化が認められなかった。特にD-Aspはほとんど存在せず、松果体における細胞外濃度は極めて低いことが明らかになった。また、イソプロテレノール投与も検討したが、ほぼ同様の結果が得られた (Fig.28)。

更に予試験的に神経細胞を非特異的に脱分極させるKCl刺激 (Fig.29) や、細胞間隙から細胞内へのグルタミン酸 (アスパラギン酸) の取り込みを阻害するジヒドロカイニン酸投与を試みたが、いずれもD-Aspの細胞外濃度に変化は認められなかった。

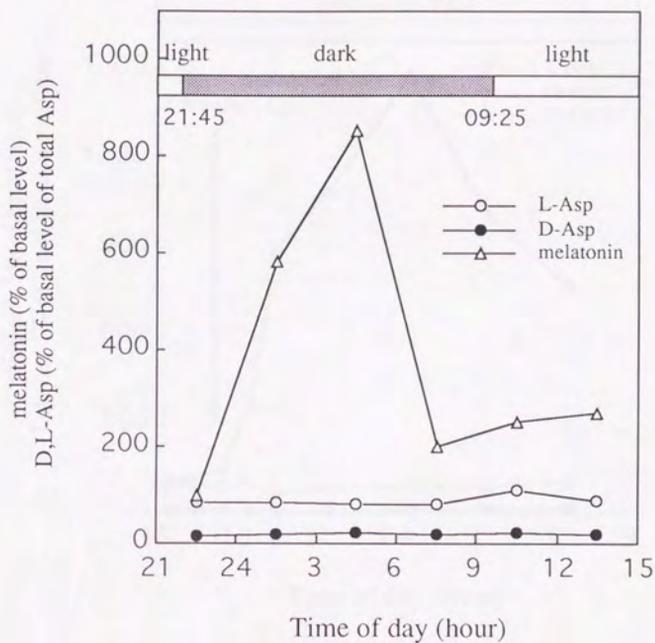


Fig.27

*Extracellular D,L-Asp and melatonin levels over the transition from the light phase to the dark phase determined by pineal microdialysis*

(rat : Sprague - Dawley, male, 6 weeks of age)

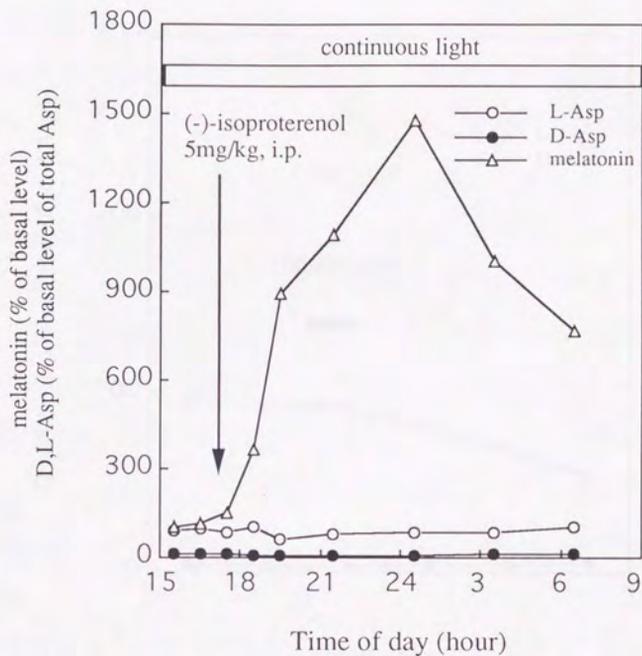
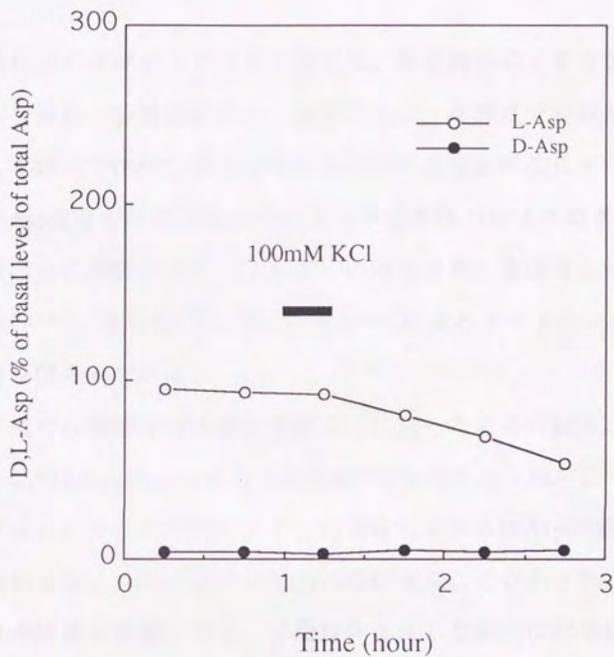


Fig.28

*Extracellular D,L-Asp and melatonin levels after i.p. administration of (-)-isoproterenol determined by pineal microdialysis*

(rat : Sprague - Dawley, male, 6 weeks of age)



**Fig.29**

*Extracellular D,L-Asp levels after stimulation by high potassium determined by pineal microdialysis*

(rat : Sprague - Dawley, male, 6 weeks of age)

### 6-3 考察

一般にマイクロダイアリシス法では、組織摘出による含量分析時よりも少量かつ低濃度の試料しか得られず、高感度分析法を必要とする。本研究ではNBD誘導体化を用いた高感度分析法により松果体中のD-Asp定量が可能であった。ラット松果体のマイクロダイアリシスは非常に困難であり、これまでの報告は数えるほどしかなく、阿瀬川等<sup>3,8)</sup>、兼松等<sup>3,9)</sup>、Drijfhout等<sup>4,10)</sup>によるメラトニン分析の報告等に限られている。

本研究では阿瀬川等の報告を改良して行った。その結果、含量分析時と比較しtotal Aspに対するD-Aspの割合がかなり低いことが明らかになった。今回の検討により、松果体におけるD-Aspの細胞外濃度は極めて低く、大部分が細胞内に存在することが示された。また第四章の結果も考慮すると、 $\beta$ 受容体を介した刺激は松果体におけるD-Aspの含量、並びにその分泌にほとんど影響を与えないものと考えられる。現在松果体D-Leuについての検討を進めており、今後の展開が期待される。

## 第七章 総括

本研究では、ODSカラムによるアミノ酸分離とキラル固定相による光学分割を組み合わせることにより、生体試料中から17種のD-アミノ酸についてfmolレベルでの微量分析を可能とした。

本方法を用いて6週齢ラットの脳内からD-Asp、D-Ser、D-Ala、D-Leuの4種類のD-アミノ酸を検出し、それぞれの脳内分布を明らかにした。D-Asp、D-Serに関してはこれまでもいくつか報告があったが、D-Alaに関しては筆者の知る限りでは初めてラット脳内における分布が明らかにされ、下垂体に存在することが示された。またD-Leuに関しては、本研究において初めてラット脳内における存在が明らかにされ、松果体及び海馬に分布することが示された。また、これらのD-アミノ酸含量には性差があるものも認められた。

次に松果体D-Asp、D-Ser、D-Leu、下垂体D-Alaについて加齢に伴う含量変化を調べた。その結果各D-アミノ酸含量はそれぞれ特有の週齢変化を示し、各アミノ酸に特有の調節機構があることが示唆された。

また松果体におけるD-Asp、D-Leu含量は、 $\beta$ アゴニストであるイソプロテレノールや、麻酔薬により変化することが明らかになった。この含量変化は時間、分のレベルで認められる変化であり、また薬物投与群と対照群の動物は全く同一の環境で飼育されていた。この事実は、これらのD-アミノ酸の含量変化が外因性の受動的な変化

によるのではなく、生体内においてD-アミノ酸の積極的な調節機構が存在することを示唆する。

更に松果体マイクロダイアリシス法を用いて、ラット松果体におけるD-Aspの細胞外濃度推移を調べた。その結果通常状態におけるD-Aspの細胞外濃度は極めて低く、大部分が細胞内に存在することが示された。また第四章の結果も考慮すると、 $\beta$ 受容体を介した刺激は松果体におけるD-Aspの含量、及びその分泌にほとんど影響を与えないことが示唆された。

これらのD-アミノ酸の機能、調節機構、由来等を詳細に検討し、生体内における役割を明らかにするのは今後の課題である。これまでの報告ではD-アミノ酸は進化的に古い生物に多く認められ、その機能として細菌では細胞壁のペプチドグリカン構成成分として使用されることが知られており<sup>2)</sup>、海に生息する二枚貝等では浸透圧の調節に使われているのではないかと考えられている<sup>4, 11)</sup>。哺乳類においては、D-Serがラット脳内においてNMDAレセプターの内在性調節因子として働いていることが示唆されており<sup>1, 3), 15)</sup>、D-Aspが組織の成長、分化等に関わっているのではないかと考えられている<sup>1, 2)</sup>が、詳しいことはほとんどわかっていない。D-Ala、D-Leuに関しては全く未解明であり、今後の検討が期待される。

生体内におけるD-アミノ酸の代謝機構としてはD-アミノ酸オキシダーゼ、及びD-アスパラギン酸オキシダーゼが挙げられる。これらの酵素は中性、酸性のD-アミノ酸をそれぞれ特異的に酸化

して2-オキソ酸とする。哺乳類では肝臓、腎臓及び脳に分布し、ラット脳内においてD-Serの分布がD-アミノ酸オキシダーゼの分布と逆相関を示すことが明らかになっている<sup>1,2)</sup>。また、新生ラットでは脳内に広く分布するD-AspがD-アスパラギン酸オキシダーゼ活性の上昇と共に消失すること<sup>1,2)</sup>、外部からのD-アミノ酸の投与により、これらの酵素活性が上昇すること<sup>2,7)</sup>等が知られており、これらの酵素は生体内におけるD-アミノ酸含量に大きく影響していると考えられる。本酵素の生体内における真の役割には未だ疑問が持たれているが、これに関してはD-アミノ酸オキシダーゼ欠損ミュータントマウスを用いた検討により、これらのマウスの腎臓、血清中には正常マウスの数十倍ものD-アミノ酸が存在することが示されている<sup>4,2)</sup>。また、このミュータントマウスでは食餌中に必須アミノ酸のL体がないと生存できないが、正常マウスではそのD体があれば生存できることが示されている<sup>4,3)</sup>ことから、D-アミノ酸オキシダーゼは少なくとも生体内においてD-アミノ酸を分解し、その一部を栄養として取り込むために使われていると考えられる。

最後にこれら生体内D-アミノ酸の由来であるが、これには生体内において生成する経路と、外部から取り込む経路が考えられる。このうち生体内における生成に関しては、微生物や昆虫等ではアラニンラセマーゼを初め、種々のアミノ酸ラセマーゼ、エピメラーゼ、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ等、D-アミノ酸の生合成に関する酵素が発見されている<sup>3)</sup>。しかし哺乳類においてはこれらの

酵素は発見されておらず、D-アミノ酸が酵素的に生合成されるかどうかは全く不明である。この他D-アミノ酸含有ペプチド等からの生成も考えられるが、D-アミノ酸残基におけるペプチド結合の切断には特殊な酵素が必要であると考えられており、これについても哺乳類ではほとんど報告されていないため、生体内における生成に関しては今後の課題である。

外部から取り込む際のD-アミノ酸の由来としては食餌由来のものと、腸内細菌由来のものが主に考えられている。このうち食餌中に関してはチーズ<sup>4,4)</sup>やワイン<sup>4,5)</sup>等、発酵を用いて作られるものにはD-Ala、D-Asp、D-Glu、D-Leu等が存在することが示されている。また、海水はD-Ala、D-Aspを初めとして大量のD-アミノ酸を含むことが示されており<sup>4,6)</sup>、ここに生息する二枚貝<sup>4,1)</sup>、蟹や海老などの甲殻類<sup>4,7)</sup>にはやはり大量のD-アミノ酸が存在することが明らかになっている。更に加熱などの処理により、蛋白質中のアミノ酸及び遊離のアミノ酸が共にラセミ化することが明らかになっており、特にAsp、Cys、Pro等はラセミ化しやすく、その他のアミノ酸も微量ながらラセミ化することが明らかになっている<sup>4,8)</sup>。腸内細菌に関してはD-Ala、D-Glu等のD-アミノ酸が存在することが示されている<sup>2)</sup>。

いずれの場合においても、これらのD-アミノ酸が脳に分布するためには腸管から吸収され、血液脳関門 (BBB) を通過する必要がある。D-アミノ酸の腸管からの吸収に関してはField等<sup>4,9)</sup>がウサギ

回腸を用いてD-Alaが吸収されること、星等<sup>5 0)</sup>がD-Ser、D-Leu、D-Met等が吸収されることを示している。更に本研究において調べた部位のうち、松果体、下垂体、視床下部ではBBBが存在しないことが明らかになっており<sup>5 1)</sup>、他の脳部位よりは血中からのD-アミノ酸透過が自由に行われると考えられる。他の部位ではBBBの透過性が問題となるが、これに関してはOldendorf等<sup>5 2) 5 3)</sup>によりD-Leu、D-Met等はL体ほどではないが透過することが示されている。

この様に生体内におけるD-アミノ酸の役割及び由来などに関してはほとんど明らかになっていないが、Dunlop等は外界から完全に隔離された系である鶏卵を用い、そのD-Asp量が発生の時期により異なることを示し<sup>1 1)</sup>、D-Aspの生体内における生成を強く示唆した。一方金野等はD-アミノ酸オキシダーゼ欠損マウスにおいて、抗生物質の一種であるアモキシリンの投与により、尿中のD-Ala含量が減少すること<sup>5 4)</sup>、同じくD-アミノ酸オキシダーゼ欠損の無菌マウスに腸内細菌を投与することにより尿中D-Ala含量が増加すること<sup>5 5)</sup>を明らかにし、本ミュータントマウスにおける生体内D-Alaの少なくとも一部は腸内細菌由来であることを示した。しかし、無菌マウス中においてはD-アミノ酸オキシダーゼの有無にかかわらず、通常マウスと同レベルのD-アミノ酸（尿中D-Ala<sup>5 5)</sup>、血中total D-アミノ酸<sup>2 3)</sup>）が確認されており、生体内D-アミノ酸の全てが腸内細菌由来ではないことも示されている。更にD'Aniello等<sup>2 7)</sup>は食餌中に与えたD-Ala及びD-Aspが脳、肝臓、腎臓に分布することを明ら

かにしている。

これらの結果は生体内のD-アミノ酸について、生体内での生成と、外部からの取り込みが共に存在することを示していると考えられる。また実際の実験においては、動物の飼育環境や食餌中のD-アミノ酸が大きく影響することが考えられ、D-アミノ酸の由来を確定することは非常に困難であると思われる。しかし同時に、これらの由来が何処であったとしても、D-アミノ酸は生体内で何らかの役割を果たしていると考えられ、その役割を解明することは意義深いと考えられる。本研究において生体内D-アミノ酸含量の積極的な調節機構の存在を示唆できたことは、これからの研究につながると期待される。

本研究において生体試料中から17種類のD-アミノ酸について微量分析が可能となり、これまで限られたアミノ酸でしか行われていなかったD-アミノ酸研究が更に進歩すると考えられる。また今回得られた知見はラット脳内におけるD-アミノ酸の制御機構を解明するための手がかりになると考えられ、D-アミノ酸の生理的役割を解明するための基礎的研究になると期待される。

## 実験の部

## 試薬

本研究において試薬類は以下のものを使用した。

- アセトニトリル： 和光純薬（大阪），HPLC用
- D-アミノ酸標準品： SIGMA chemical company (St. Louis, USA)
- L-アミノ酸標準品： SIGMA chemical company (St. Louis, USA)
- D,L-アミノ酸標準品： SIGMA chemical company (St. Louis, USA)
- EDTA 2Na 2水和物： ナカライテスク（京都），特級
- (-)-イソプロテレノール： SIGMA chemical company  
(St. Louis, USA)
- NBD-F： 同仁化学（熊本）
- 塩化カリウム： 関東化学（東京），特級
- 塩化カルシウム2水和物： 関東化学（東京），特級
- 塩化ナトリウム： 関東化学（東京），特級
- カルバミド酸エチル： 和光純薬（大阪），一級
- クエン酸1水和物： 関東化学（東京），特級
- $\alpha$ -クロラロス： 和光純薬（大阪），特級
- 酢酸： 関東化学（東京），特級
- 酢酸ナトリウム3水和物： 関東化学（東京），特級
- ジエチルエーテル： 関東化学（東京），特級
- 水酸化ナトリウム： 関東化学（東京），特級
- 炭酸水素ナトリウム： 関東化学（東京），特級

- THF： 関東化学（東京），HPLC用
- TFA： ナカライテスク（京都），アミノ酸配列分析用
- ブドウ糖： 関東化学（東京），特級
- ペントバルビタール： 大日本製薬（大阪）  
（ネンブタール注射液）
- ほう酸： ナカライテスク（京都），電気泳動用
- 水： Milli-Q reagent system (Millipore, Bedford, USA)により精製  
したMilli-Q水を使用した。
- メタノール： 和光純薬（大阪），HPLC用
- メラトニン： Aldrich (Milwaukee, USA)
- モレキュラーシーブス： ナカライテスク（京都）
- 硫酸マグネシウム7水和物： 関東化学（東京），特級
- リン酸二水素カリウム： 関東化学（東京），特級

# 実験方法

## 第二章 生体内D-アミノ酸の微量分析法の確立

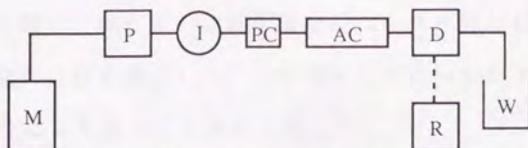
### 2-2 標品を用いたアミノ酸の光学分割

#### NBD-Fによる誘導体化反応

D, L-アミノ酸のNBD化反応は福島等の方法<sup>2,5)</sup>に基づいて行った。100  $\mu$ MのD及びL-アミノ酸 200mMほう酸buffer(pH 8.0)溶液20  $\mu$ lに、50mMのNBD-F CH<sub>3</sub>CN溶液 (CH<sub>3</sub>CNはモレキュラーシーブスで脱水) 30  $\mu$ lを加え、60°Cで5分間反応させた。これに1%酢酸 MeOH溶液950  $\mu$ lを加え、必要に応じて1%酢酸 MeOH溶液で希釈し、HPLC分析に用いた。

#### HPLCシステム (キラル固定相法、アミノ酸の光学分割)

各アミノ酸の光学分割に使用したHPLCシステムのフローダイアグラムは下記の通りである。



M: mobile phase, 0.05mM-10mM citric acid / MeOH; flow rate, 0.5ml-1.0ml / min

P: pump, Hitachi L-6000 I: injector, Rheodyne 7125

PC: precolumn, Tosoh ODS-80T<sub>M</sub> 3.2mm i.d. × 1.5cm; temperature, ambient

AC: analytical column, Sumichiral OA-2500S or R 4.6mm i.d. × 25cm; temperature, ambient

D: detector, JASCO FP-920; ex 470nm, em 530nm R: integrator, JASCO 807-IT W: waste

## 2-3 生体試料中の微量D-アミノ酸分析法の確立

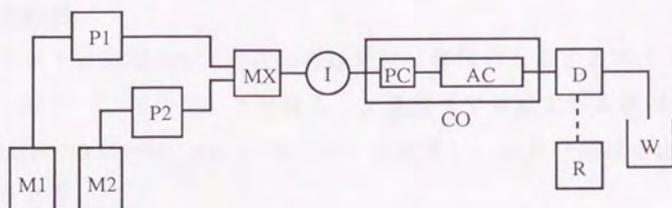
### 生体試料中のD-アミノ酸分析

生体試料中のD-アミノ酸分析は本論文Fig.9に示したように行った。ラットの組織に対し10倍量以上のMeOHを加え、氷上でホモジナイズを行った(700r.p.m., 20times)。この一部を2500gで5分間遠心し、上清 $20\mu$ lを減圧下乾固させた。これに50mM ほう酸buffer(pH 8.0)  $20\mu$ l及び $H_2O$   $10\mu$ lを加えよく攪拌した。ここに20mM NBD-FCH<sub>2</sub>CN溶液を $30\mu$ l加え、60°Cで2分間反応させた。次に1%TFAを $440\mu$ l加え、 $0.5\mu$ mのメンブレンフィルターで濾過した。この溶液を試料とし、逆相HPLCによりアミノ酸分離を行った(HPLC条件は後述)。ここで各アミノ酸を定量し、同時に分取を行った。ここで得られた各アミノ酸フラクションを減圧乾固させ、適当量の1%酢酸MeOH溶液に溶解した。次に各アミノ酸に対しキラル固定相(Sumichiral OA-2500S or R)を用いて光学分割を行い、D-アミノ酸の存在を調べ、D/L比を決定した。更にD体の認められたアミノ酸に関しては、逆の立体配置を持つキラル固定相を用いてD-アミノ酸の存在を確認した。この様にして得られたアミノ酸定量値とD/L比により各アミノ酸を定量した。

### HPLCシステム (ODSカラム、各アミノ酸の分離、定量)

各アミノ酸の分離と定量に用いた逆相モードのHPLCシステムの

フローダイアグラムは下記の通りである。



M1: mobile phase 1, 1%THF 0.02%TFA / 10% CH<sub>3</sub>CN M2: 1%THF 0.02%TFA / CH<sub>3</sub>CN  
 gradient; time(min), 0 18 50 83 90 flow rate, 1.0ml / min  
 mobile phase M1%,100 100 75 75 25

P1,P2: pump, JASCO 880-PU MX: solvent mixing module, JASCO 880-30

I: injector, Rheodyne 7125 CO: column oven, JASCO 860-CO

PC: precolumn, Tosoh ODS-80T<sub>3</sub> 3.2mm i.d.×1.5cm; temperature, 35°C

AC: analytical column, YMC J'sphere ODS-M80 4.6mm i.d.×25cm; temperature, 35°C

D: detector, JASCO 821-FP; ex 470nm, em 540nm R: integrator, JASCO 807-IT W: waste

なお、各アミノ酸の光学分割には2-2で示したHPLCシステムを使用した。また、本章で例として用いた松果体試料の調製法は第三章に示す。

### 第三章 ラット脳内におけるD-アミノ酸の分布

#### 実験動物

ラットはSD系SPF, 6週齢の雄性及び雌性のものを日本チャールス・リバー(神奈川)より購入し、使用まで東京大学薬学部動物舎(Light 7:00-19:00, Dark 19:00-7:00)で飼育し、水及び餌は自由に摂取させた。

#### ラット脳組織の摘出及び分画

ラットをエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より脱血致死させた後、直ちに脳組織を摘出し松果体、大脳、小脳、海馬、下垂体、延髄、視床下部に分画した。なお、今回分画しなかった中脳、橋などの部位については大脳とともに分画し、重量的にはほとんど大脳が占めることから本研究では大脳として扱った。これらの組織を秤量し、使用まで-20℃で保存した。大脳、小脳、海馬、延髄については10倍量のHPLC用MeOHでホモジナイズし、下垂体、視床下部、松果体については500 $\mu$ lのHPLC用MeOHでホモジナイズを行った。これを2-3で示した生体試料中のD-アミノ酸の微量定量法を用いて分析を行った。なお、組織ホモジナイズ、遠心分離後、大脳、小脳、海馬、延髄についてはHPLC用MeOHで10倍に希釈、視床下部については5倍に希釈し、その後の分析を行った。

#### 統計処理

本章においては分析値を平均値 $\pm$ S.E.M.(標準誤差)として示し、性差に関してはStudentのt検定を用いて有意差を求めた。

## 第四章 ラット脳内D-アミノ酸の週齢変化

### 実験動物

ラットはSD系SPF, 雄性2週齢から36週齢のものを日本チャールス・リバーより購入し、第三章と同じように飼育した。なお、2週齢のラットは離乳していないため、母親と一緒に飼育した。また老齢ラットに関しては週齢指定ができないため、20週齢は5ヶ月齢のものを、36週齢は9ヶ月齢のものを使用した。

### 脳組織の分画とD-アミノ酸分析

ラット脳組織は第三章に記した方法により、松果体及び下垂体を分画し、D-アミノ酸分析を行った。

### 統計処理

本章においては分析値を平均値 $\pm$ S.E.M. (標準誤差)として示し、ANOVA (一元配置分散分析法) 後、Duncan多群検定を用いて有意差を求めた。

## 第五章 ラット松果体中D-Asp及びD-Leuの種々の 薬物投与時における含量変化

### 5-2 $\beta$ アゴニスト投与による松果体中D-Asp、D-Leuの 含量変化

#### 実験動物

ラットはSD系SPF、雄性6週齢のものを日本チャールス・リバーより購入し、第三章と同じように飼育した。

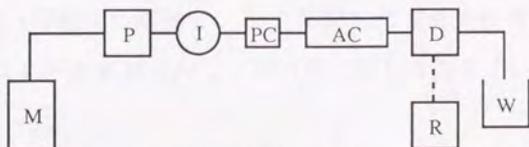
#### イソプロテレノール処理

ラットをウレタン (10% ethyl carbamate, 0.25%  $\alpha$ -chloralose/saline) 10ml/kg i.p.で麻酔し、イソプロテレノール投与群は(-)-イソプロテレノール (5mg/kg i.p.)を麻酔後30分で投与し、投与後3.5時間で松果体を第三章に記した方法で摘出し、D-アミノ酸分析を行った。対照群は麻酔後4時間で同様の操作を行った。なお、両群ともラットの様子を見ながら、0.25等量の追加麻酔を行った。なお、松果体摘出時はウレタン麻酔下のままで行い、特にエーテル麻酔はしなかった。

#### メラトニン分析

D-アミノ酸分析と同時に松果体中のメラトニン含量を測定した。第三章で記した方法により松果体をHPLC用MeOHでホモジナイズし、

遠心分離した上清を15 $\mu$ l採取し、直接HPLCで分析した。メラトニン分析に用いたHPLCシステムは下記の通りである。なお、このシステムは阿瀬川等の方法<sup>5,6)</sup>を改良して組み立てた。



M: mobile phase, 10mM CH<sub>3</sub>COONa 2 $\mu$ M EDTA (pH4.0) / MeOH=7 / 3; flow rate, 1.0ml / min  
 P: pump, JASCO 880-PU I: injector, Rheodyne 7125  
 PC: precolumn, Tosoh ODS-80T<sub>M</sub> 3.2mm i.d. × 1.5cm; temperature, ambient  
 AC: analytical column, Tosoh ODS-80T<sub>M</sub> 4.6mm i.d. × 15cm; temperature, ambient  
 D: detector, Hitachi F-1080; ex 280nm, em 330nm R: integrator, JASCO 807-IT W: waste

### 統計処理

本章においては分析値を平均値±S.E.M. (標準誤差) として示し、Studentのt検定を用いて有意差を求めた。

### 5-3 松果体中D-Asp、D-Leu含量の麻酔薬による変化

実験動物及び統計処理に関しては5-2と同様に行った。

#### 各種麻酔薬の投与

無麻酔についてはラットを撲殺後断頭し、松果体を摘出した。エーテル麻酔は第三章に記した方法を用い、麻酔後直ちに松果体を摘出した。ウレタン麻酔は、5-2で記したウレタン溶液10ml/kg i.p., ペ

ントバルビタール麻酔は50mg/kg i.p. (大日本製薬, ネンブタール注射液)で行い、それぞれラットの様子を見ながら0.25等量の追加麻酔を行った。ウレタン、ペントバルビタールに関しては初回の麻酔から4時間後に開腹し、5-2に記した方法で松果体を摘出した。

これらの試料に対し、第三章に記した方法でD-アミノ酸分析を行った。

## 第六章 松果体マイクロダイアリシス法を用いた 細胞外D-Asp量の測定

実験動物は5-2と同様のものを用いた。

### 松果体マイクロダイアリシス手術

本研究において松果体マイクロダイアリシスの手術は阿瀬川等<sup>38)</sup>の方法を改良して行った。ラットをウレタンで麻酔し(5-2, 10ml/kg i.p.)、ラットの頭部が水平となるように脳定位固定装置(ナリシゲ, 東京)に固定した。次にラットの頭皮を切開し、頭蓋骨を露出させ、ブレグマ、ラムダの位置を決定した。ラムダ右上方約5mm四方を、上矢状静脈洞、静脈洞交會を傷つけぬよう注意深くドリルで削り取った。次に硬膜を切開し、LM軸45度、DV軸45度の傾きを持たせたプローブを直交座標系においてブレグマからAP後方8.3mm, LM ±0mm, DV 下方2.0mmの座標に挿入した。

### マイクロダイアリシスサンプリング

マイクロダイアリシス装置はBAS(東京)より購入した。ポンプはCMA100マイクロインジェクションポンプ、プローブはCMA11(内径0.24mm, 長さ1mm)、フラクションコレクターはCMA170を使用した。透析液はSalineもしくはACSFを用いた。なお、ACSFの組成は下記の通りである。

ACSF (artificial cerebrospinal fluid)

124mM NaCl, 5mM KCl, 2.4mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3mM MgSO<sub>4</sub>,

25.9mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.24mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Glucose / Milli-Q water

なお、KCl刺激時には上記に100mM KClを加え、浸透圧調節のためNaClを24mMにして使用した。

#### マイクロダイアリシスサンプル中のD-Asp量の分析

透析液を15 $\mu$ l採取し、ここに200mM ほう酸buffer(pH8.0) 15 $\mu$ l、50mM NBD-F CH<sub>3</sub>CN溶液30 $\mu$ lを加え60 $^{\circ}$ Cで5分間反応させた。次に1%酢酸 MeOH溶液190 $\mu$ lを加え、このうち15 $\mu$ lをキラル固定相を用いたHPLCに注入し直接D-Asp分析を行った。

なお、本章においては透析開始時刻等が異なるため統計処理は行わず、各実験において複数回検討を行い、結果の再現性を確認した。

## 引用文献

1. J. J. Corrigan: D-Amino acids in animals, *Science*, 164, 142 (1969).
2. 左右田健次: D-アミノ酸の生化学 (I), *化学*, 32, 517 (1977).
3. 左右田健次: D-アミノ酸の生化学 (II), *化学*, 32, 627 (1977).
4. 金野柳一、安村美博: D-アミノ酸酸化酵素の生理的役割, *蛋白質核酸 酵素*, 36, 54 (1991).
5. P. D. Hoeprich: Alanine: cycloserine antagonism VI. demonstration of D-alanine in the serum of guinea pigs and mice, *J. Biol. Chem.*, 240, 1654 (1965).
6. P. M. Helfman and J. L. Bada: Aspartic acid racemisation in dentine as a measure of ageing, *Nature*, 262, 279 (1976).
7. N. Fujii, K. Satoh, K. Harada and Y. Ishibashi: Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in  $\alpha$  A-crystallin from human lens, *J. Biochem.*, 116, 663 (1994).
8. E. H. Man, M. E. Sandhouse, J. Burg and G. H. Fisher: Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain, *Science*, 220, 1407 (1983).
9. P. N. McFadden and S. Clarke: Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: Possible step in the repair of aged membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2460 (1982).
10. 長田洋子: 生体に存在する D-アミノ酸, *札幌医誌*, 58, 271 (1989).
11. A. Neidle and D. S. Dunlop: Developmental changes in free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat, *Life Sci.*, 46, 1517, (1990).

12. A. Hashimoto, T. Oka and T. Nishikawa: Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery, *Eur. J. Neurosci.*, 7, 1657 (1995).
13. A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka and K. Takahashi: Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging, *J. Neurochem.*, 60, 783 (1993).
14. J. A. Kemp and P. D. Lesson: The glycine site of the NMDA receptor - five years on, *Trends Pharmacol. Sci.*, 14, 20 (1993).
15. M. J. Schell, M. E. Molliver and S. H. Snyder: D-Serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3948 (1995).
16. Y. Nagata, K. Yamamoto and T. Shimojo: Determination of D- and L-amino acids in mouse kidney by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 575, 147 (1992).
17. G. H. Fisher, A. D'Aniello, A. Vetere, L. Padula, G. P. Cusano and E. H. Man: Free D-aspartate and D-alanine in normal and alzheimer brain, *Brain Res. Bull.*, 26, 983 (1991).
18. Y. Nagata, R. Masui and T. Akino: The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma, *Experientia*, 48, 986 (1992).
19. Y. Kera, H. Aoyama, H. Matsumura, A. Hasegawa, H. Nagasaki and R. Yamada: Presence of free D-glutamate and D-aspartate in rat tissues, *Biochim. Biophys. Acta*, 1243, 282 (1995).
20. T. Fukushima, M. Kato, T. Santa and K. Imai: Enantiomeric separation and

- sensitive determination of D,L-amino acids derivatized with fluorogenic benzofurazan reagents on Pirkle type stationary phases, *Biomed. Chromatogr.*, 9, 10 (1995).
21. A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Hayashi, N. Fujii, K. Harada, T. Oka and K. Takahashi: The presence of free D-serine in rat brain, *FEBS Lett.*, 296, 33 (1992).
22. A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka, K. Takahashi and T. Hayashi: Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with *N*-tert-butylloxycarbonyl-L-cysteine and *o*-phthaldialdehyde, *J. Chromatogr.*, 582, 41 (1992).
23. Y. Nagata and T. Akino: D-amino acid in mouse tissues are not of microbial origin, *Experientia*, 46, 466 (1990).
24. Y. Watanabe and K. Imai: Pre-column labelling for high-performance liquid chromatography of amino acids with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole and its application to protein hydrolysates, *J. Chromatogr.*, 239, 723 (1982).
25. 福島健：博士学位論文「D-アミノ酸の高感度高速液体クロマトグラフィーの開発と応用」（東京大学），1995.
26. N. Watanabe, T. Toyo'oka and K. Imai: HPLC electrochemical fluorometric detection of amino acids including tryptophan using 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, *Biomed. Chromatogr.*, 2, 99 (1987).
27. A. D'Aniello, G. D'Onofrio, M. Pischetola, G. D'Aniello, A. Vetere, L. Petrucelli and G. H. Fisher: Biological role of D-amino acid oxidase and

- D-aspartate oxidase, *J. Biol. Chem.*, 268, 26941 (1993).
28. K. Imai, T. Fukushima, K. Hagiwara and T. Santa: Occurrence of D-aspartic acid in rat brain pineal gland, *Biomed. Chromatogr.*, 9, 106 (1995).
29. D. S. Dunlop, A. Neidle, D. McHale, D. M. Dunlop and A. Lajtha: The presence of free D-aspartic acid in rodents and man, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141, 27 (1986).
30. K. Sato, H. Kiyama, S. Shimada and M. Tohyama: Gene expression of KA type and NMDA receptors and of a glycine transporter in the rat pineal gland, *Neuroendocrinology*, 58, 77 (1993).
31. 小林英司：内分泌系のアトラス (1987), pp16, 講談社, 東京.
32. K. Matsukawa, I. Ninomiya and N. Nishiura: Effects of anesthesia on cardiac and renal sympathetic nerve activities and plasma catecholamines, *Am. J. Physiol.*, 265, R792 (1993).
33. T. Honda and I. Ninomiya: Changes in AdSNA and arterial catecholamines to coronary occlusion in cats, *Am. J. Physiol.*, 255, H704 (1988).
34. T. Honda, I. Ninomiya and T. Azumi: Cardiac sympathetic nerve activity and catecholamine kinetics in cat hearts, *Am. J. Physiol.*, 252, H879 (1987).
35. D. N. Krause and M. L. Dubocovich: Regulatory sites in the melatonin system of mammals, *TINS*, 13, 464 (1990).
36. 松嶋少二：松果体の神経支配とその意義, 北海道医学雑誌, 68, 150 (1993).
37. G. Paxinos and C. Watson: The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd. edition (1986), Academic Press Inc., San Diego, USA.

38. T. Azekawa, A. Sano, H. Sei, A. Yamamoto, K. Aoi and Y. Morita: Pineal microdialysis in freely moving rats, *Brain Res. Bull.*, 26, 413 (1991).
39. 兼松伸枝：松果体メラトニンリズムの光調節機構，  
北海道医学雑誌，69, 46 (1994).
40. W. J. Drijfhout, C. J. Grol and B. H. C. Westerink: Microdialysis of melatonin in the rat pineal gland: methodology and pharmacological applications, *J. Neurochem.*, 61, 936 (1993).
41. O. Matsushima, H. Katayama, K. Yamada and Y. Kado: Occurrence of free D-alanine and alanine racemase activity in bivalve molluscs with special reference to intracellular osmoregulation, *Marine Biol. Lett.*, 5, 217 (1984).
42. Y. Nagata, K. Yamamoto, T. Shimojo, R. Konno, Y. Yasumura and T. Akino: The presence of free D-alanine, D-proline and D-serine in mice, *Biochim. Biophys. Acta*, 1115, 208 (1992).
43. R. Konno and Y. Yasumura: Involvement of D-amino-acid oxidase in D-amino acid utilization in the mouse, *J. Nutr.*, 114, 1617 (1984).
44. H. Bruckner, M. Langer, M. Lupke, T. Westhauser and H. Godel: Liquid chromatographic determination of amino acid enantiomers by derivatization with o-phthalaldehyde and chiral thiols application with reference to food science, *J. Chromatogr. A* 697, 229 (1995).
45. M. Kato, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma and K. Imai: Determination of D-amino acids, derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F), in wine samples by high-performance liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.*, 9, 193 (1995).

46. C. Lee and J. L. Bada: Dissolved amino acids in the equatorial Pacific, the Sargasso Sea, and Biscayne Bay, *Limnol. Oceanogr.*, 22, 502 (1977).
47. E. Okuma, E. Fujita, H. Amano, H. Noda and H. Abe: Distribution of free D-amino acids in the tissues of crustaceans, *Fisheries Sci.*, 61, 157 (1995).
48. 秋山知子、笹川立：D, Lアミノ酸の一斉分析法とその応用, 蛋白質核酸 酵素, 40, 76 (1995).
49. M. Field, S. G. Schultz and P. F. Curran: Alanine transport across isolated rabbit ileum, *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 236 (1967).
50. 星猛：D型アミノ酸及び $\beta$ -アミノ酸の腸管吸収機構について, 必須アミノ酸研究, 129, 42 (1991).
51. 佐野豊：神経科学 形態学的基礎 I ニューロンとグリア (1995), pp661, 金芳堂, 京都.
52. W. H. Oldendorf and J. Szabo: Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers, *Am. J. Physiol.*, 230, 94 (1976).
53. W. H. Oldendorf: Stereospecificity of blood-brain barrier permeability to amino acids, *Am. J. Physiol.*, 224, 967 (1973).
54. R. Konno, A. Niwa and Y. Yasumura: Intestinal bacterial origin of D-alanine in urine of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase, *Biochem. J.*, 268, 263 (1990).
55. R. Konno, T. Oowada, A. Ozaki, T. Iida, A. Niwa, Y. Yasumura and T. Mizutani: Origin of D-alanine present in urine of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase activity, *Am. J. Physiol.*, 265, G699 (1993).
56. T. Azekawa, A. Sano, K. Aoi, H. Sei and Y. Morita: Concurrent on-line

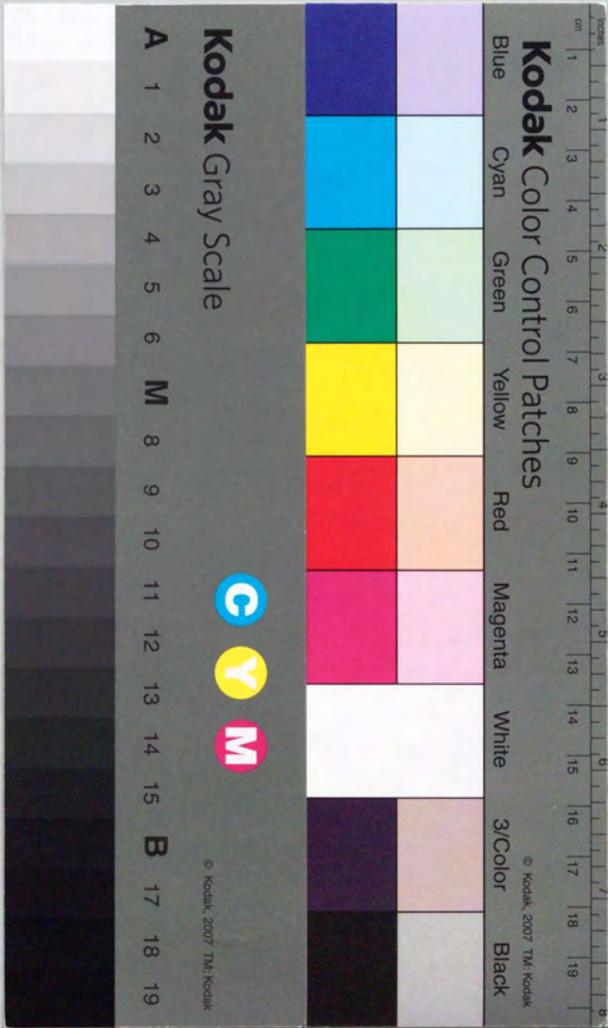
sampling of melatonin in pineal microdialysates from conscious rat and its analysis by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, 530, 47 (1990).

## 謝辞

本研究を行うに際し、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学薬学部薬品分析化学教室の今井一洋教授に謹んで感謝いたします。また終始御指導、御助言を賜りました同研究室の本間浩助教授に謹んで感謝いたします。また懇切なる御助言、御教示を頂きました三田智文博士、萩原健一博士、福島健博士並びに東京大学薬学部薬品分析化学教室の皆様へ深く感謝いたします。

マイクロダイアリシス法に関し、種々御教示頂きました便宜を図って頂きました、東京大学薬学部薬品作用学教室の松木則夫助教授、横浜市立大学医学部の阿瀬川孝治博士に深く感謝いたします。





**Kodak** Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

**Kodak** Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007. TM: Kodak