[微量栄養素研究 第8集 1991]

ODSラットにおける脳内アスコルビン酸の定量

中 西 由季子[1)]・川 村 美笑子[1)]・井 戸 達 雄[2)]・木 村 修 一[1)]
(東北大学, [1)]農学部栄養化学*, [2)]サイクロトロン・RIセンター**)

Determination of Ascorbic Acid in Rat Brain

Yukiko NAKANISHI[1)], Mieko KAWAMURA[1)], Tatsuo IDO[2)], Syuichi KIMURA[1)]
Faculty of Agriculture and [2)] Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University

In ODS-od/od rats (ODS rats) that is hereditarily unable to synthesize ascorbic acid, both extracellular and whole tissues in frontal cortex AsA concentration were measured by HPLC-ECD. Acute ascorbic acid deficiency caused the decline of AsA concentration, but extracellular AsA concentration earlier decreased compared with the whole frontal cortex. AsA concentration in ODS rats fed AsA deficient diet followed by the AsA supplement diet was maintained the normal level on the 21st day of repletion. Studies are in progress in our laboratory trying to analyze the possible mechanisms on these changable AsA in brain.

L-アスコルビン酸 (AsA) の生理作用としては, 補酵素作用, 抗酸化作用, また神経調節因子の機能を有していることが知られている。特に, 脳において, その作用は重要であると考えられる。最近, ラット脳内AsAの存在は一様ではなく局在することが明らかにされ[1,2)], この局在性と前述のAsAの作用とがAsAの生理作用を説明するものと考えられる。

筆者等は先に, ラット脳線状体, 海馬, 及び大脳皮質の細胞間AsAの直接定量を試み, AsAが高濃度に存在するのは大脳皮質であり, AsA欠乏が脳における細胞間AsAに与える影響は発育段階にあるほうが大きいことを明らかにした[3)]。本研究では, AsA欠乏及び回復過程におけるODS (od/od) ラット大脳皮質のAsAの挙動を経時的に調べた。

実 験 方 法

1) ラットの飼育

遺伝的にAsAを生合成できないODSラット, 雄, 8週令 (日本クレア) にAsA欠乏飼料 (日本ク

*所在地：仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1 (〒981)
**所在地：仙台市青葉区荒巻字青葉 (〒981)

レア）を与えてpaired-feeding法により飼育した。

AsA欠乏群には，蒸留水を与えて3週間飼育した後，1 mg/mlのAsAを含む飲料水に切り替えて，更に3週間飼育した。対照群には，AsAを含む飲料水を与えて6週間飼育した。

2）血清中，肝臓中，大脳皮質全組織中アスコルビン酸の定量

0，0.5，1，1.5，3週の各時点で，断頭により屠殺，採血の後，直ちに脳を摘出，ドライアイスで瞬間凍結後−80°Cで保存した。

血液から常法により血清を得，4倍量の2％メタリン酸溶液を加えて，遠心分離により除タンパクを行い，0.45 μmのフィルターで濾過し，測定試料とした。脳については，50mgの組織に10倍量の2％メタリン酸溶液を加えてマイクロチューブホモジナイザーでホモジナイズし，遠心分離で除タンパクの後0.45 μmのフィルターで濾過し，更に2％メタリン酸溶液で50倍に希釈し測定試料とした。また，肝臓については，100mgの組織に10倍量の2％メタリン酸溶液を加えてホモジナイズし，遠心分離で除タンパクの後0.45 μmのフィルターで濾過し，更に2％メタリン酸溶液で20倍に希釈し測定試料とした。

AsAの定量は，2，5-dihydroxybenzoic acid（DBA）を内部標準として，高速液体クロマト法で，SAXカラム（ラジアルパック SAX10 μ：ウォーターズ）を使用し，移動相として10mM リン酸緩衝液（pH 5.0）流速1.0ml/minで分離し，電気化学検出器（ECD-100：エイコム）を使用しグラファイト電極＋750mVで測定した。

3）マイクロダイアリシスによる大脳皮質細胞間アスコルビン酸の直接定量

測定は，2）の測定日に対応させて行った。

マイクロダイアリシス用のプローブとしてエイコム社の直管式膜長2 mmのものを使用した。

ラットをペントバルビタール（5mg/kg i. p.）で麻酔して脳定位固定装置に固定し，ラット脳アトラスに基づいて，Bregma + 3.2mm，左1.9mm，深さ2mm，の場所にガイドカニューレを歯科用セメントで固定した。測定時に，再生セルローズのマイクロチューブでできた透析用プローブ（エイコム社製）をガイドカニューレに挿入し，自由運動下に，リンゲル液をマイクロインフュージョンポンプで1 μm/mlの流速に20分間流して試料とした。AsAの定量には，ラジアルパック SAX 10 μmカラム，ECD検出器，オートインジェクターを組み合わせたオンライン液体クロマトシステム（エイコム社）でDBAを内部標準とし，移動相として10mM リン酸緩衝液（pH 5.0）を1.0ml/minの速さで流して測定した。

測定に供したラットはすべてガイドカニューレが大脳皮質に挿入されていることを確認した。

4）AsA欠乏症からの回復

マイクロダイアリシス装置を用いて，AsAを含む飲料水に切り替えた時点から1週ごとの大脳皮質細胞間AsAを測定し，回復した時点での血清，肝臓，大脳皮質全組織中AsAを測定した。

結果と考察

Fig. 1にラットの体重変化を示した。ODS（od/od）ラットをAsA欠乏食で飼育すると1.5週目までは成長が認められたが3週目では体重が減少した。AsAを含まない飲料水で3週間飼育後，AsA

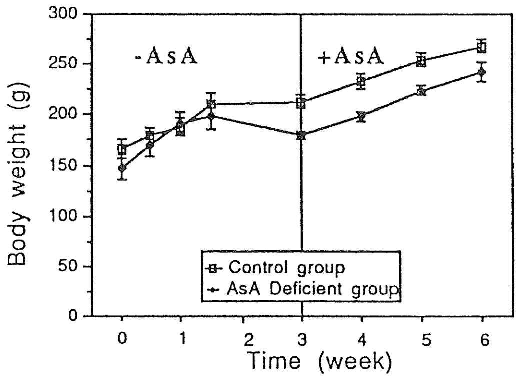

Fig. 1. Changes of body weight of ODS-od/od rats fed the AsA deficient diet followed by the AsA supplement diet.
Each point represents mean value of three rats

(1mg/ml) を含む飲料水に切り替えて3週間飼育すると，2群の体重は再び増加し，その様子は同様であった。

Fig.2 に大脳皮質全組織中，肝臓中，血清中 AsA 量の変動を示した。

ODS ラットの大脳皮質全組織中 AsA 量は飼育日数に伴い減少したが，その変動は一様ではなかった。1.5週目まで変動は緩やかであったが，3週目では対照の3％まで減少した。大脳皮質全組織中では3週目で減少が認められたが，肝臓中では1週目で，血清中では0.5週目で減少した。AsA 欠乏食によって起こる組織中 AsA の低下に致る時間がそれぞれ異なっていることが示された。

AsA 欠乏症状である体毛の粗雑化は2週目頃に確認されたが，欠乏症状が表面化する以前から血清中や肝臓中では欠乏状態が進行していた。血清中や肝臓中に比べて大脳皮質全組織中の AsA の低下は緩やかであり，脳における AsA の必要性が高いことが示された。

Fig.3 には大脳皮質細胞間 AsA 量の変動を示した。大脳皮質細胞間 AsA 量の変動は，大脳皮質全組織中 AsA 量の変動とは異なり，0.5週目で対照の22％まで減少しその後緩やかに低下した。以前行った実験で，AsA 欠乏時点でのラット脳線状体の細胞間 AsA 量は，正常の約半分までの低下であったが[3)]，大脳皮質細胞間 AsA は検出限界以下まで減少していた。

AsA を含まない飲料水から AsA (1mg/ml) を含む飲料水に切り替えて飼育すると，大脳皮質細胞間 AsA量は3週間後に対照の89.4％まで回復した。大脳皮質全組織及び血清中の AsA 量は各々442 μg/g wet wt. of tissue, 7.61 μg/ml まで回復したが，肝臓では，回復が認められたものの低値 (104 μg/g wet wt. of tissue) を示した。この AsA 欠乏から回復における AsA の挙動については，ラットの週令や AsA の投与方法等を考慮しさらに検討が必要であると考えられる。

AsA は水溶性物質であるが，脳において細胞間に比べ細胞内の AsA の低下は緩やかであり，脳細胞内に AsA の調節にかかわる機構がある可能性が推察された。AsA は生体内で free な状態で存在しているものと考えていたが，AsA の輸送や細胞内での存在形態にタンパクなどが関与しているのではないかと考えている。

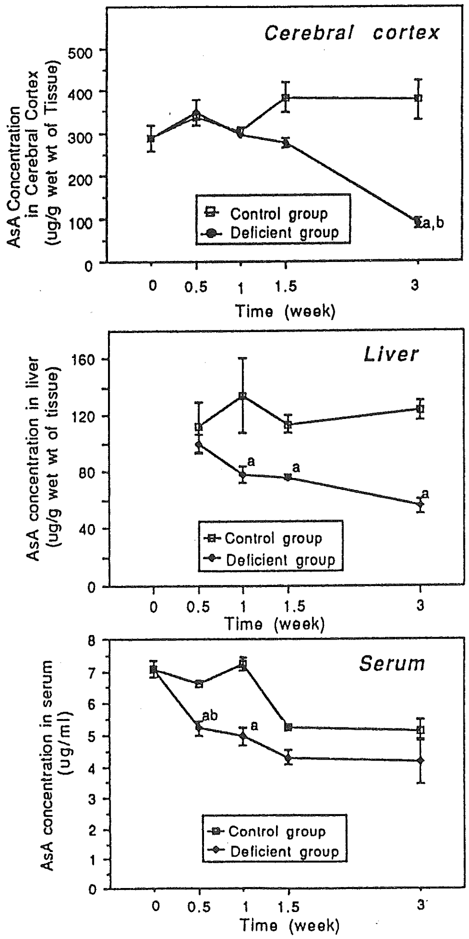

Fig. 2. Effect of AsA deficiency on AsA levels in rat tissues.

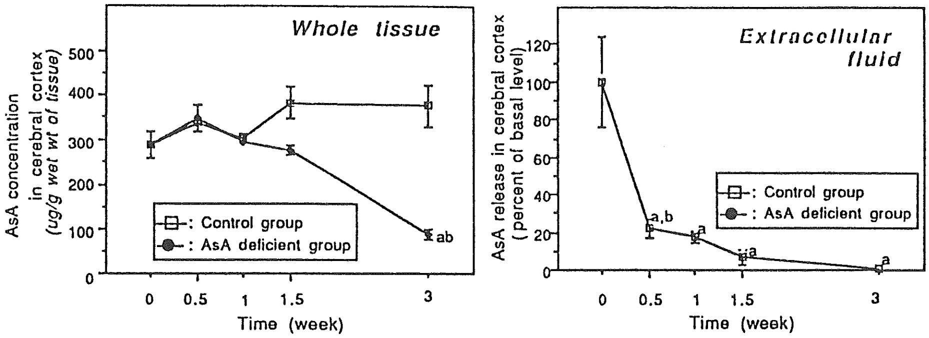

Fig. 3. Effect of AsA deficiency on AsA levels in whole tissue (left) and extracellular fluid (right) at frontal cortex.
Data are mean ± SD (left : N = 3, right ; N = 6).
a : $p < 0.05$ compared to control group,
b : $p < 0.05$ compared with deficient group alone.

文　献

1. STAMFORD, JONATHAN A., ZYGMUNT L. KRUK and JULIAN MILLAR (1984) Brain Res. 299：289-295
2. WILSON, JOHN X. (1989) J. Neurochem. 53：1064-1071
3. 井戸達雄，熊谷洋紀，阿部一也，木村修一，中西由季子，川村美笑子（1990）微量栄養素研究第7集：147-154