

Micro dialysis によるラット脳内のアスコルビン酸 (AsA) の測定

井戸達雄¹⁾・熊谷洋紀¹⁾・阿部一也¹⁾

木村修一²⁾・中西由季子²⁾・川村美笑子²⁾

(¹⁾東北大学サイクロトロン・RIセンター*, (²⁾東北大学農学部栄養化学**)

Determination of Ascorbic Acid in Rat Brain by Micro Dialysis

Tatsuo IDO¹⁾, Hiroki KUMAGAI¹⁾, Kazunari ABE¹⁾,

Syuichi KIMURA²⁾, Yukiko NAKANISHI²⁾ and Mieko KAWAMURA²⁾

¹⁾Cyclotron and Radioisotope Center and ²⁾Faculty of Agriculture, Tohoku University

Ascorbic acid (AsA) is the coenzyme of dopamine β -hydroxylase which catalyzes the conversion of dopamine to norepinephrine, and is an important reductant in the brain as vitamin E. Inter-cellular AsA concentration of Wistar rat brain and ODS (od/od) rat brain, which has a hereditary defect in L-AsA synthesizing ability, were measured by a micro dialysis technique. Detection limit of AsA with HPLC-ECD for the dialyzed sample was regulated in 0.05 μ g/ml. Inter-cellular AsA concentration in frontal cortex, in striatum and in hippocampus of Wistar rat were 15.1, 7.7 and 10.0 μ g/ml, respectively. No significant difference of AsA concentration were observed in Wistar rat and ODS rat fed the AsA sufficient diet. The level of AsA in ODS rat brain under the AsA deficient diet for 3 weeks had been decreased, especially in young one and were recovered quickly by a supplement of AsA.

ビタミンCの還元型であるL-アスコルビン酸 (AsA) は、生体内において脳および副腎に高濃度に存在し、これらの組織において重要な役割を担っていると考えられている。AsAの作用の本質はまだ不明であるが、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。例えば、AsAはドーパミンをノルアドレナリンに変える酵素 (β -ヒドロキシダーゼ) の補酵素であり、またシナプス小胞からの神経伝達物質放

*所在地：仙台市青葉区荒巻字青葉 (〒980)

**所在地：仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 (〒981)

出の調節¹⁾、下垂体細胞からのプロラクチン放出、プロスタグランジン E₂産生の調節³⁾に関与している。さらに AsA により、神経伝達物質受容体に対する神経伝達物質の結合量が変化すること⁴⁾などの報告がある。また最近、神経細胞の細胞膜中の神経伝達物質受容体が、活性酸素ラジカルにより変化すること⁵⁾が報告されたが、AsA はビタミン E (α -トコフェロール) と共に、活性酸素や過酸化脂質などの生成を防ぐラジカルスカベンジャーのひとつとして考えられている。従って、AsA 欠乏状態においては、脳内で何らかの神経伝達物質の代謝および神経伝達物質受容体に変化を来し、それに伴う神経伝達の異常が誘発されていると考えられるので、脳局所における AsA の量の測定は、脳内 AsA 量の変化と神経伝達系の変化との相関を明らかにする上で重要である。

従来 AsA の生理的作用を検討する際に実験動物としてモルモットが広く利用されてきた。モルモットは、飼料の選択性および実験手技の上で必ずしも使いやすいものではなかったが、近年、遺伝的に AsA を生合成できないラット (ODS ラット: Osteogenic Disorder Strain Rat) が開発され⁶⁾実験動物として供給されるようになった。

本研究では、ODS ラットを用いて AsA 欠乏症を誘発させ、自由運動下のラット脳局所細胞間 AsA 量を経時的に、マイクロダイアリシス法で測定することを試みた。

実験方法

1) ラットの飼育

ODS (Osteogenic Disorder Strain) ラット 4~6 週令 (日本クレア) に AsA 欠乏飼料 (日本クレア) を 3 週間与えて AsA 欠乏症を誘発した。対照ラットには、1 mg/ml の AsA を含む飲料水を与えた。また AsA 合成能をもつ ODS (+/+) ラットは蒸留水と AsA 欠乏飼料で飼育し、Wistar ラットは蒸留水と普通飼料で飼育した。

AsA 測定用試料は、一定期間飼育後断頭により屠殺し採血、その後すぐに脳を摘出、ドライアイスで瞬間凍結後 -80℃ で保存した。

2) アスコルビン酸の定量

血液試料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 μ m のフィルターでろ過し、測定試料とした。また脳試料については、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 μ m のフィルターでろ過し、さらに 2% メタリン酸溶液で 50 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 (pH5.0) 流速 1.5~2.0ml/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。

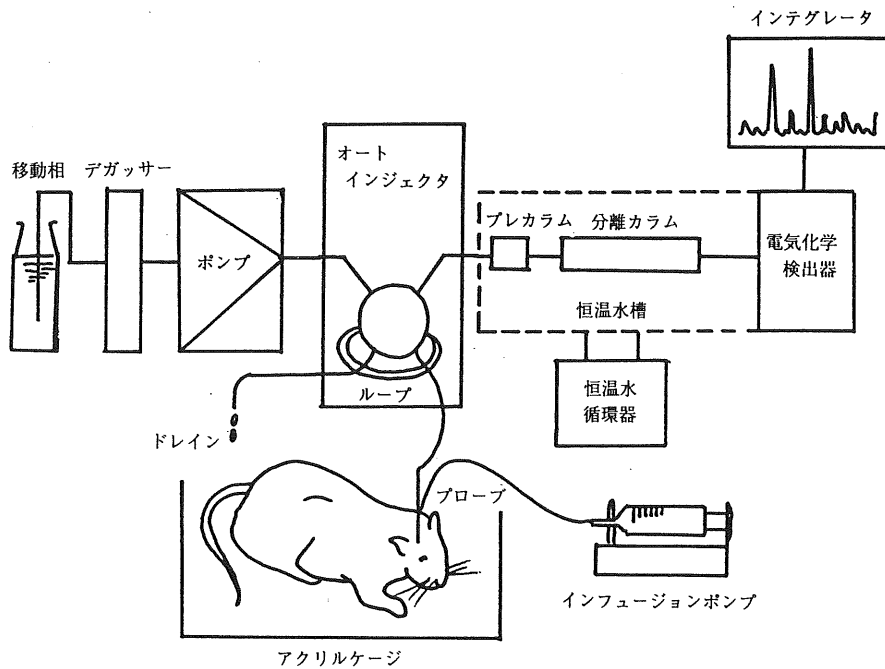


Fig. 1. オンライン マイクロダイアリシス システム

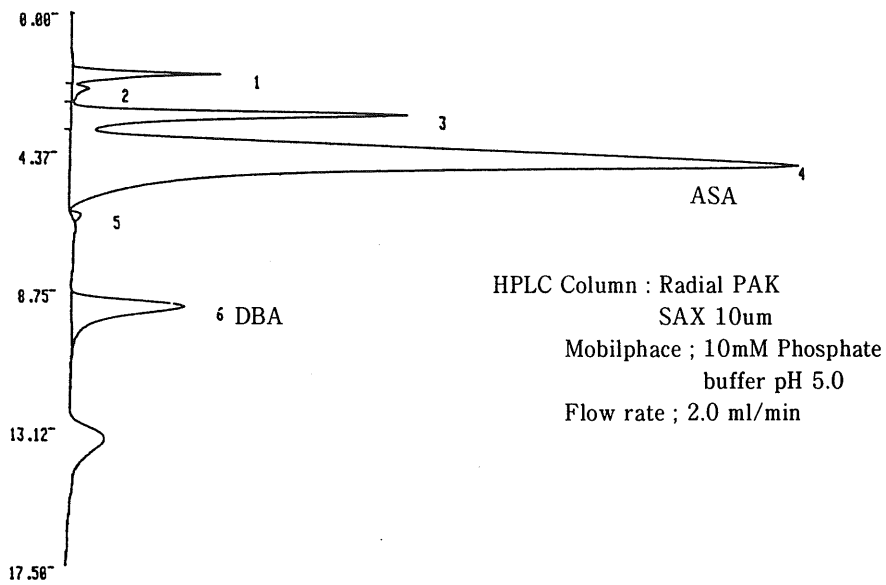


Fig. 2. Microdialysis-HPLC of AsA in rat brain.

3) マイクロダイアリスによるアスコルビン酸の直接定量

マイクロダイアリス用のプローブとしてエイコム社の直管型を使用し、皮質測定には膜長 2 mm を、線条体・海馬測定には膜長 3 mm のものを使用した。

ラットをペントバルビタール (40mg/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 2 mm (皮質), Bregma +0.2mm, 左 3 mm, 深さ4.5mm (線条体), Bregma -4.8mm, 左 5 mm, 深さ 5 mm (海馬) 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、再成セルローズのマイクロチューブで出来た透析プローブ (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 μ l/min の流速に15分間流して試料とした。AsA の定量には、ラジアルパック SAX10 μ m カラム, ECD 検出器, オートインジェクターを組合せたオンライン液体クロマトシステム (エイコム社) で DBA を内部標準として測定した (Fig 1)。移動相として10mM リン酸緩衝液 (pH5.0) を2.0ml/min の速さで流した時, AsA は4.7分, DBA は9.3分に溶出した (Fig. 2)。

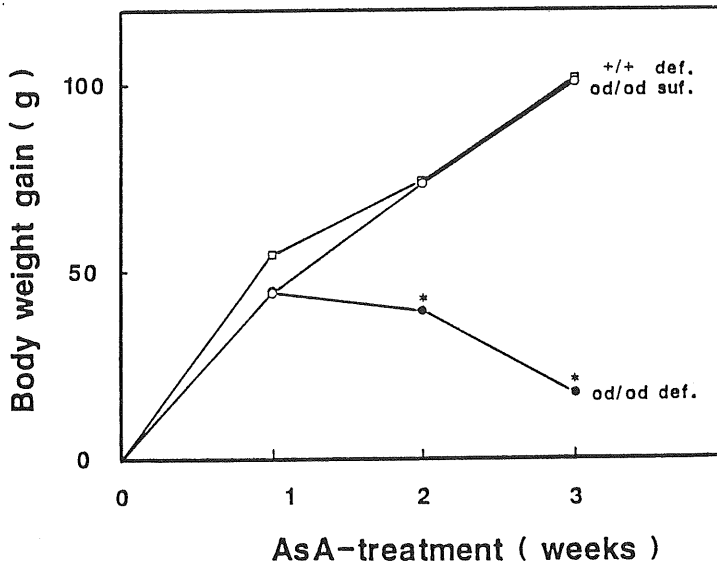


Fig. 3. Effect of AsA-deficient or AsA-sufficient diet on body weight gain of ODS rats. Each point represents mean value of fifteen rats.

結果と考察

1) ODS (od/od) ラットを AsA 欠乏食で飼育すると 1~2 週間で体重の増加が止まり、以後減少した。これに対し対照群 (AsA の生合成ができる ODS ラット: ODS (+/+)) および AsA を加えた飼料で飼育した ODS (od/od) ラット) では通常の成育を示した (Fig 3)。AsA 欠乏症として、欠乏食飼育後

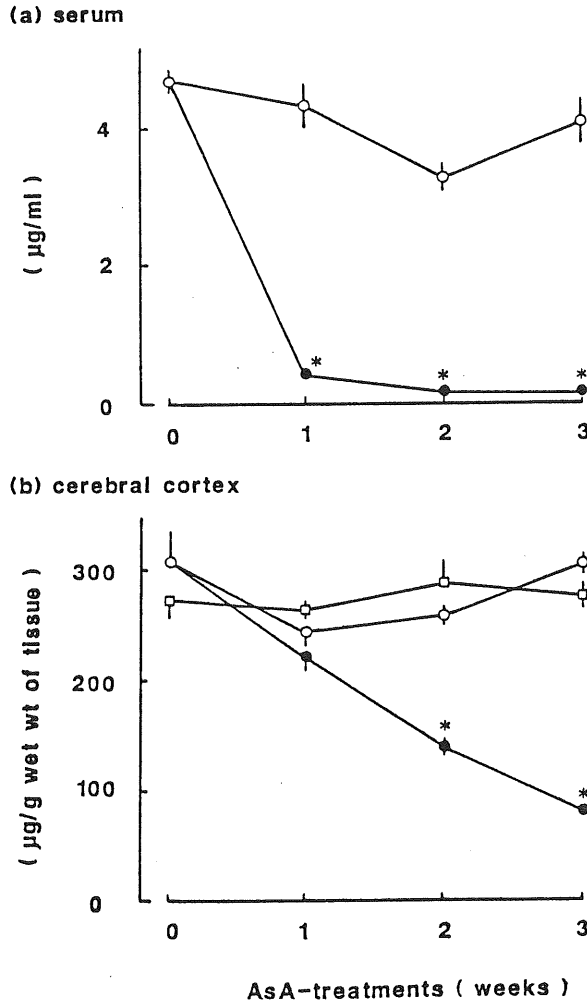


Fig. 4. Time course of AsA concentrations in ODS rats (a) serum and (b) cerebral cortex. (—□—) : +/+ def., (—●—) : od/od def., (—○—) : od/od suf. Vertical bar represents S.E.M. of five animals. * $p < 0.001$ compared with control (od/od suf.) rats.

約2週間で体毛の粗雑化がみられ、3週間で眼瞼や鼻孔周辺の出血、背骨の湾曲や歩行異常がみられた。2) ODSラットの血清中AsA濃度は、欠乏食飼育後1週間ではじめの約1/10に急激に減少した。その後徐々に減少し欠乏後3週間では0.12 µg/mlにまで減少した。対照群では実験開始後2週間目に少し低い値を示したが、40±0.7 µg/mlの範囲に保たれていた (Fig. 4 a)。一方ODSラット脳のホモジナイズ中のAsA濃度は、欠乏食飼育後1週間で、はじめの約70%に減少し、2週間、3週間ではそれぞれ45%、26%にまで減少した。対照群では実験開始後1週間目に少し減少したがほぼ一定の濃度に保たれていた (Fig. 4 b)。

血清に比べて脳の 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。さらに血清 AsA 濃度を横軸に脳の AsA 濃度を縦軸にとり動物ごとにプロットしてみたところ血清 AsA 濃度が 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上ある時は脳の AsA 濃度はほぼ一定に保たれているが、それ以下だと血清 AsA 濃度に比例して減少することがわかった (Fig. 5)。

3) 脳内透析法 (マイクロダイアリシス) による AsA の透析率 (回収率) は、細胞間の AsA の濃度、透析液の流速、透析チューブの長さによって変わるが、今回使用した透析プローブ (カットオフ分子量 : 50,000) について実測した透析率を Table 1 に示した。このデータに基づいて、ラット脳について実測した AsA 濃度より、透析率を求め、脳細胞間 AsA 濃度を算出した。

Wistar ラットおよび ODS (od/od) ラットについては線条体、海馬、前脳皮質の細胞間 AsA 量は、

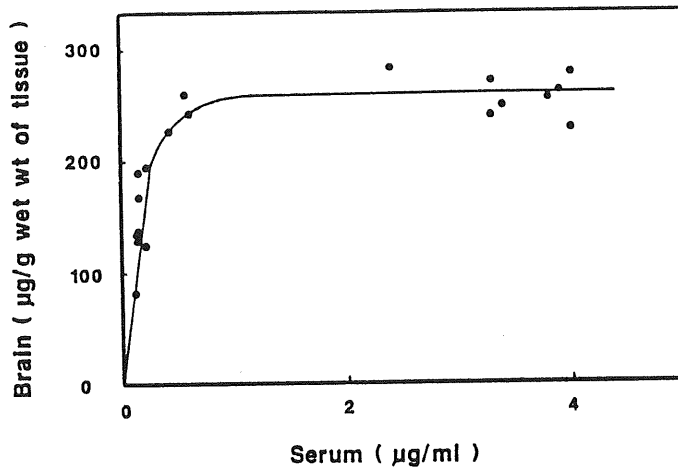


Fig. 5. Correlation of AsA concentrations between serum and cerebral cortex in ODS rats.

Table 1. Recovery of AsA by Microdialysis

Celulose; I. D. 0.2mm, Thickness; 11 μm ,
Flow; 1 $\mu\text{l/min}$ of Ringer's solution (37°C)

AsA Conc.	Length of tube	Recovery	Comment
1 $\mu\text{g/ml}$	3 mm	23.3 %	} Striatum Hippocampus
0.5 $\mu\text{g/ml}$	3 mm	15.0 %	
1 $\mu\text{g/ml}$	2 mm	13.6 %	} Cerebral cortex
0.5 $\mu\text{g/ml}$	2 mm	10.4 %	

Table 2. Inter-Cellular AsA concentration of Wistar rat and ODS rat brain

	Wistar rat	ODS rat
Body weight	280 - 300 g	110 - 120 g
Regional brain		
Frontal cortex	15.1 $\mu\text{g/ml}$	16.5 $\mu\text{g/ml}$
Striatum	7.7 $\mu\text{g/ml}$	6.4 $\mu\text{g/ml}$
Hippocampus	10.0 $\mu\text{g/ml}$	7.0 $\mu\text{g/ml}$

Table 3. Effect of AsA deficiency on ODS rat brain

Rat	Before treatment	After 3w treatment
Adult (7w)		
Striatum	5.8 $\mu\text{g/ml}$	3.4 $\mu\text{g/ml}$
Young (4w)		
Striatum	6.4 $\mu\text{g/ml}$	<0.05 $\mu\text{g/ml}$
Hippocampus	7.0 $\mu\text{g/ml}$	<0.05 $\mu\text{g/ml}$

Table 2 に示した結果が得られた。Wistar 系, ODS 系で体重に差があったが各局所での細胞間 AsA 量には両者の間にほとんど差は認められなかった。一般に Wistar ラット全脳ホモジナイズ中の AsA 量は 300~350 $\mu\text{g/g}$ であるが, 細胞間に放出される AsA 量は最も濃度の高い皮質で 15~17 $\mu\text{g/ml}$ であった。このことは, AsA 欠乏状態で脳内 AsA の減少が血清中濃度の変化より緩やかであることを良く説明できる。

AsA 欠乏状態での細胞間 AsA 量は, 若い ODS ラット (4 W) の場合, 欠乏 3 週間目の線条体, 海馬は検出限界 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。しかし, 生後 7 週間の ODS ラットでは欠乏 3 週間目の線条体において, 正常の約半分 (3.4 $\mu\text{g/ml}$) であり, AsA 欠乏が脳における細胞間 AsA に与える影響は, 発育段階にある方が大きいことが判った (Table 3)。

また, 細胞間 AsA 量の低下した ODS ラットに AsA (1 mg/ml) を添加した飲料水を与えると 2 日目には, 細胞間 AsA 量がほぼ正常に戻った。すなわち, 細胞間 AsA 量の変化は, 可逆的な現象であることが示唆された。

結 論

ラット脳細胞間 AsA 量は, マイクロダイアリシスと HPLC-ECD の組合せにより, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ まで測定することができたが, この検出限界は, サンプリグタイム (15分) をより長くすることによってさらに感度良く測定できる。またこの方法は, 脳局所細胞間の AsA 量の変化を経時的にとらえること

ができ, AsA と神経伝達系との相関性を解析するのに非常に有効であると考えられる。

文 献

1. KUO, C. -H., F. HATA, H. YOSHIDA, A. YAMATODANI and H. WADA (1979) *Life. Sci.* 24 : 911-916
2. SHIN, S. H. and R. STIRLING (1987) *J. Endocr.* 118 : 287-294
3. SIEGEL, B. V. and J. I. MORTON (1984) *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 54 : 339-342
4. TODD, R. D. and P. A. BAUER (1988) *J. Neurochem.* 50 : 1505-1512
5. YONEDA, Y., K. KURIYAMA and M. TAKAHASI (1985) *Brain Res.* 333 : 111-122
6. MIZUSHIMA, Y., T. HARAUCHI, T. YOSHIZAKI and S. MAKINO (1984) *Experientia.* 40 : 359-361