

胎児, 新生児の血漿 Tryptophan およびその代謝産物の動態

岡山大学医学部産科婦人科学教室

江口 勝人 上村 茂仁 米沢 優
光井 行輝 水谷 靖司 工藤 尚文

Tryptophan and its Metabolite Concentrations in Human Plasma during the Perinatal Period

Katsuto EGUCHI, Shigehito KAMIMURA, Masaru YONEZAWA,

Yukiteru MITSUI, Yasushi MIZUTANI and Takafumi KUDO

Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University Medical School, Okayama

概要 分娩時母体静脈血, 臍帯動静脈血を, さらに生後1日目, 5日目の新生児血を採取し, 血漿中 tryptophan およびその代謝産物を測定した. 方法は HPLC で, tryptophan と17種の metabolite を同時に定量した結果, 以下のごとき成績が得られた.

1. tryptophan (total, free) は母体血より臍帯血の方が有意に高値であつたが, 生後1日目には激減した.
 2. kynurenine (total, free) 濃度も母体血より臍帯血の方が有意に高かつた. しかし, tryptophan とは異なり, 生後もその値は低下しなかつた.
 3. tryptophan, kynurenine とも血中%free は母児間で差がなく一定に保たれていた.
 4. 3-OHAA 濃度は母体血より臍帯血の方が50~60倍高く, 胎児ではエネルギー産生や NAD 産生への関与が示唆された.
 5. indole 系の metabolite は母体血より臍帯血の方が有意に高値であつた.
- tryptophan 代謝は胎児, 新生児の発育に関与していることが推測された.

Synopsis The concentration of tryptophan (free and protein bound) and its metabolites in the plasma of the maternal vein and in the umbilical vein, umbilical artery and neonatal vein were determined by high performance liquid chromatography. The plasma levels of tryptophan and most of its metabolites in the umbilical vein and artery were significantly higher than those in the maternal vein. Especially the 3-OHAA level in umbilical blood was approximately 50 times as high as that in maternal blood. The concentration of total tryptophan in the plasma of the neonatal vein showed a marked decrease at one day after birth in comparison with that at birth, but the total kynurenine concentration was not decreased in the plasma of the neonatal vein. In the blood, ratios of free to total tryptophan and kynurenine were kept at a constant level throughout the perinatal period. In conclusion, the present study suggests that tryptophan metabolism may play an important role in fetal development.

Key words: Tryptophan • Kynurenine • Perinatal period

緒 言

Tryptophan (Trp) は芳香族に属する必須アミノ酸であり, 糖代謝, Serotonin (5-hydroxy-tryptamine) 代謝と関連している. 特に, この Trp は血中でその80~90%がアルブミンと結合しており, 残りが遊離型 (free Trp) として存在する⁵⁾. しかも free Trp の増減が脳細胞内の Trp 濃度を微妙に調整しているといわれている³⁾⁴⁾.

したがって, Trp の代謝は中枢神経系を中心と

した胎児, 新生児の発育, あるいは周産期適応にも重要な役割を果たしていると推測されるが, この方面の知見は極めて乏しい. この原因としては Trp の測定上での困難さが挙げられる. Trp は他のアミノ酸に比べて比較的血中濃度が低く, 通常のアミノ酸分析器では感度の問題から, 正確な測定値が得られなかつた.

そこで今回著者らは, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた direct assay 法で, Trp

およびその代謝産物17種の同時かつ迅速測定を行った。また, Trp, Kynurenine (Kyn) については total (free+bound) と free に分けて測定し, 興味ある知見を得たので報告する。

研究方法

1. 研究対象

岡山大学医学部附属病院分娩部で分娩した妊娠37~41週までの正期産, 正常経産分娩で AFD 児出生例48例を対象とした。分娩直後に母体血と臍帯血を採取した。臍帯血はまだ拍動のある間に臍帯静脈血と臍帯動脈血を別々に採取した。新生児は生後翌日, 5 日目に heel puncture で採血した。

2. 測定装置および条件 (図1)

Trp およびその代謝産物の測定には, 既報¹¹⁾¹²⁾¹⁵⁾のごとく HPLC system (Toyo Soda) を用いた。すなわち, 二つのカラムを使用した col-

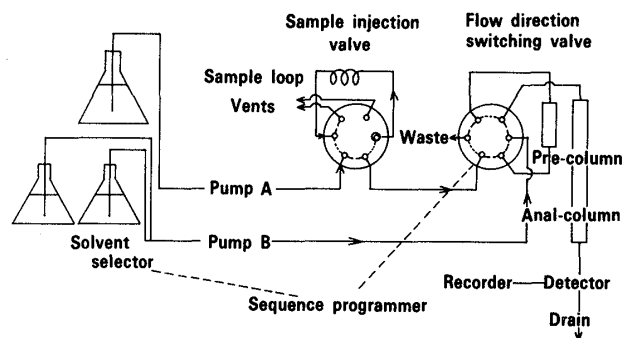


図1 使用した HPLC システムの block diagram

umn switching 法で, 最初のカラムは protein coated ODS を充填した短いプレカラムで, 次のカラムは分析のためのものである。100 μ l の血漿を前処理なしに直接 HPLC に注入すると, Trp と代謝産物は第2カラムの stepwise elution method で分離され, これらは二つの検出器, つま

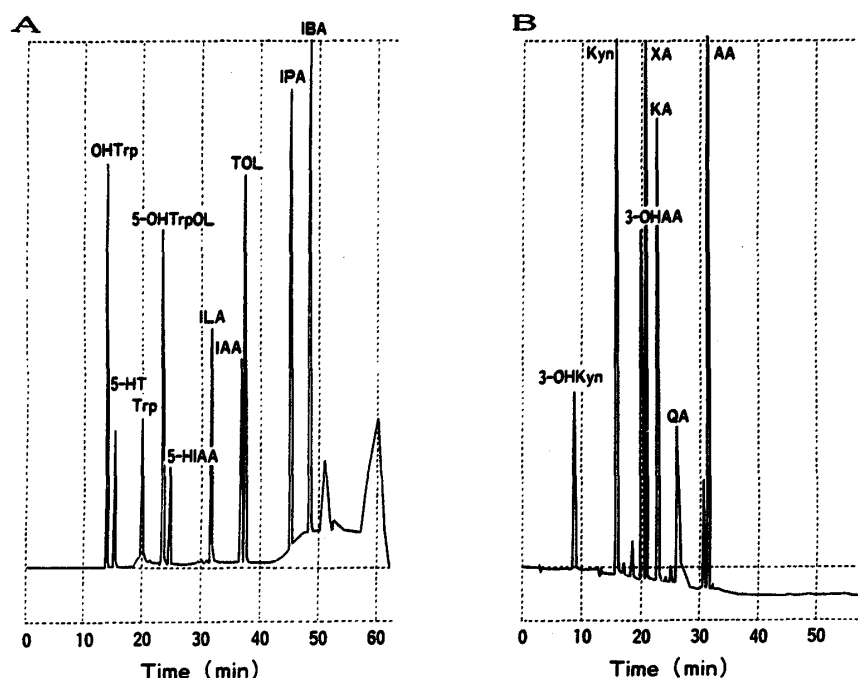


図2 tryptophan とその代謝産物のクロマトグラム. A: Tryptophan metabolites in series of indole were determined by spectrophotometric detector (EX 287, EM 340); B: Metabolites through kynurenine were determined by ultra violet spectrophotometry (350nm) (Trp, 1nmol; other indole metabolites, 100pmol; 3-OHKyn, Kyn, XA and AA, 500pmol; 3-OHAA, QA and AA, 2nmol). Peaks: Trp, tryptophan; 5-OHTrp, 5-hydroxytryptophan; 5-HT, serotonin; 5-OHTrpOL, 5-hydroxytryptophol; 5-HIAA, 5-hydroxy indoleacetic acid; ILA, indoleacetic acid; IAA, indoleacetic acid; TOL, tryptophol; IPA, indolepropionic acid; IBA, indolebutyric acid; 3-OHKyn, 3-hydroxykynurenine; Kyn, kynurenine; 3-OHAA, 3-hydroxyanthranilic acid; XA, xanthurenic acid; KA, kynurenic acid; QA, quinaldic acid; AA, anthranilic acid.

り蛍光検出器 (UV-8: Toso) と分光光度計 (RF 535: Shimazu) に連結して記録した。

3. 検体処理

ヘパリン処理を行つたシリンジで採血後、ただちに 4℃ で 3,000 回転 10 分間遠心して血漿を分離した。Trp (total), Kyn (total) と他の代謝産物は血漿をそのまま、そのうち特に Trp と Kyn については限外濾過を行つて free のものも測定した。

このシステムでの再現性は 3% 以内であり、回収率は 90~100% であつた。典型的なクロマトグラムを図 2 に示す。

なお、統計的解析には Student's t test を用い

た。

研究成績

1. 母体静脈血、臍帯動静脈血における Trp およびその代謝産物の濃度 (表 1)

臍帯血漿中の Trp 濃度は母体血よりも有意 ($p < 0.01$) に高値を示したが、動静脈差は認められなかつた。Kyn 濃度は母体血よりも臍帯血の方が約 2.5 倍と有意 ($p < 0.01$) に高値であつた。3-OHAA (3-hydroxy anthranilic acid) は母体血よりも臍帯血の方が 50~60 倍高値であり、また XA (xanturenic acid), KA (kynurenic acid) もわずかではあるが、統計学上有意 ($p < 0.05 \sim 0.01$) に臍帯血の方が高値を示した。また, indole

表 1 母体血、臍帯血の tryptophan およびその代謝産物の濃度

	Plasma of maternal vein (pmol/ml)	Plasma of umbilical vein (pmol/ml)	Plasma of umbilical artery (pmol/ml)
Trp	39,700±19,500	83,500±24,500**	83,200±12,100**
5-OHTrp	41.9±14.9	10.3±1.9**	11.2±1.9**
ILA	352±195	831±379**	902±405**
IAA	592±324	1,856±322**	1,752±268**
IPA	322±132	570±185*	602±112*
Kyn	1,700±800	4,200±1,800**	4,300±1,500**
3-OHAA	12.0±23.0	527.0±233.0***	702.0±312.0***
XA	188±84	295±28**	258±27**
KA	20.5±11.3	38.1±7.7*	39.8±9.3*
AA	413±15	387±15	432±24

Values are expressed as mean±SD (n=48)

Abbreviations: Trp, tryptophan; 5-OHTrp, 5-hydroxy tryptophan; ILA, indolelactic acid; IAA, indoleacetic acid; IPA, indolepropionic acid; Kyn, kynurenine; 3-OHAA, 3-hydroxy anthranilic acid; XA, xanturenic acid; KA, kynurenic acid; AA, anthranilic acid.

Significantly different from maternal vein blood: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

表 2 母体血、臍帯血、新生児血における free tryptophan および free kynurenine 濃度

	Tryptophan			Kynurenine		
	Total (nmol/ml)	Free (nmol/ml)	(%)	Total (nmol/ml)	Free (nmol/ml)	(%)
Maternal vein	39.6±21.4	7.5±0.7	19.0±2.0	1.17±1.91	0.09±0.02	5.33±0.94
Umbilical vein	82.6±37.3*	16.4±2.3*	19.9±2.5	4.12±1.64*	0.23±0.06*	5.63±1.32
Umbilical artery	83.4±14.2*	17.5±3.5*	21.0±2.7	4.25±1.62*	0.22±0.14*	5.18±1.67
Neonatal vein						
Days after birth						
1	53.5±18.2	9.4±3.5	17.5±0.25	4.47±4.10	0.21±0.05	3.85±0.30
5	69.5±3.2	12.7±1.8	18.3±0.42	4.90±2.90	0.29±0.09	4.12±0.18

Values are expressed as mean±SD (n=20).

Significantly different from values in maternal vein and neonatal vein on the 1st day after birth: *, $p < 0.01$.

系の ILA (indolelactic acid), IAA (indoleacetic acid), IPA (indolepropionic acid) もそれぞれ母体血よりも臍帯血の方が有意に高い値であつた。しかし, 5-OHTrp (5-hydroxy tryptophan), AA (anthranilic acid) については母児間で濃度差はなかつた。

2. 母体静脈血, 臍帯動静脈血, 新生児静脈血における free Trp および free Kyn の濃度 (表 2)

free Trp も前述の total Trp と同様, 母体血よりも臍帯血の方が有意 ($p < 0.01$) に高かつたが, その比率, すなわち %free は両者間に有意差は認められなかつた。一方, 生後は血中 total Trp, free Trp とも急激に減少したが, %free はやや低値であるものの有意差はなかつた。

Kyn も total, free と臍帯血で有意 ($p < 0.01$) に高値であつたが, %free は母児間で全く差がなかつた。生後は Trp と異なり, total Kyn, free Kyn とも臍帯血と同レベルで推移した。%free は, やや低値ではあるものの母児間での有意差は認められなかつた。

考 案

短期間に急速な成長, 発育を遂げる胎児の栄養は, もっぱら母体に依存しており, 特に蛋白合成の源となるアミノ酸は, 胎盤を通じて供給される。その通過様式は能動輸送で, 哺乳動物では種属差はないとされており, すべてのアミノ酸は母体血漿濃度に比べて, 胎児側の方が 2 ~ 4 倍高い¹⁰⁾。し

かし, 胎児を一つの臓器と考え, 個々のアミノ酸を臍帯静脈—臍帯動脈の濃度差, つまり net balance でみると, 非必須アミノ酸では alanine, その他では例外なく必須アミノ酸が胎児側に取り込まれており, 逆に glutamine や glutamate は胎児側から排出されていた¹⁾。この時, 著者らはアミノ酸分析器で検討したが, 必須アミノ酸のうち Trp については十分なデータが得られなかつた。

Trp は芳香族アミノ酸で脳の代謝に密接に関与していると推測されるが, 周産期における知見は乏しい。これは前述のごとく測定法に問題があつたためである。そこで, 高速液体クロマトグラフィーにより, Trp とその代謝産物を同時に, しかも血漿 100 μ l という微量サンプルの direct assay に成功したが, この方法は吉田との共同研究¹¹⁾¹²⁾¹⁵⁾によるもので, 現在のところほぼ満足すべき測定法と考えている。

Trp の代謝経路は serotonin 産生系のほかに, Kyn 産生系, indole 産生系の三つに大別することができる (図 3)。今回の測定系では serotonin はピークとして十分測定できたが, serotonin 自身は血小板に多量に含まれているため, 採血条件によつて値は大幅に異なるので, データ解析からは除外した。つまり, 血中の serotonin を測定して評価するためには, platelet rich plasma のごとく特殊な処理が必須である。

さて, Trp は total, free と臍帯血よりも母体血よりも臍帯

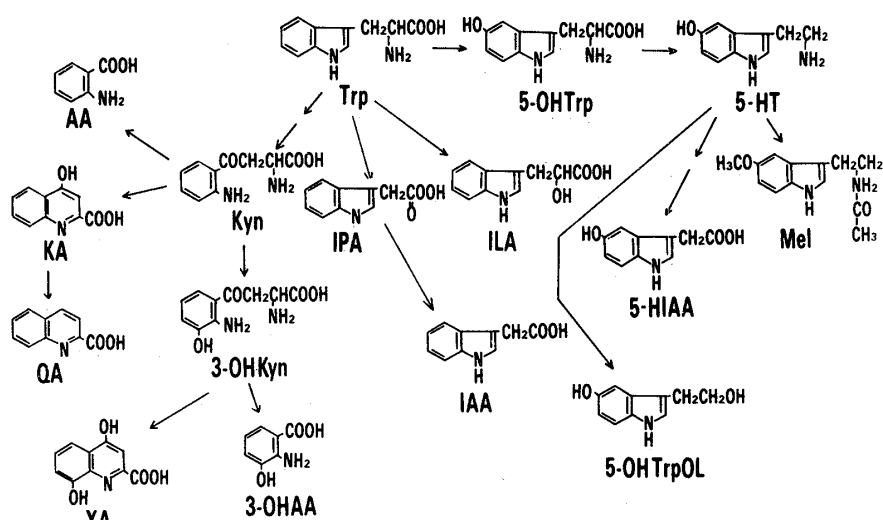


図 3 tryptophan およびその代謝経路

血の方が約2倍の高値であり、他のアミノ酸と同様に能動輸送で母体から供給されていると考えられる。生後1日目に新生児血中 Trp レベルが低下するのは、分娩によつて母体からの供給が途絶えるためであり、5日目にやや上昇するのは哺乳によるものであろう。事実母乳、特に初乳には多量の Trp が含まれている¹⁶⁾。一般に、free Trp 濃度は栄養状態、ストレス、あるいはある種の薬剤によつて変化し、血中 free Trp 濃度が上昇すると、脳の Trp が増加し、serotonin 産生を促進するといわれている⁶⁾⁹⁾¹³⁾。分娩は母児にとつて相当のストレスになり、特に新生児は生後数日間はいわゆる飢餓の状態になる。今回の著者らの成績では臍帯血の free Trp 濃度は母体血より高く、生後1日目は臍帯血の約1/2に減少し、哺乳が確立する生後5日目では上昇傾向が認められ、絶対値としては変動したが、Trp の%free は胎児、新生児期を通して有意な変動を認めなかつた。

Kyn は Trp 代謝の中間代謝産物で、Trp 同様血中では albumin と結合した bound Kyn と free Kyn が存在する。Kyn 自身は哺乳動物での生物活性は認められていないが、血中の Kyn 濃度が Trp の脳組織への取り込みと、serotonin 代謝を調節している可能性もある。したがって、周産期の中樞神経系の発達に密接に関与しているのかもしれない。

臍帯および新生児血中の Kyn 濃度は total, free とともに母体血の約3～4倍と高値であつたが、これは全く新しい知見である。しかし、母児間、臍帯動静脈間の%free は差が認められなかつた。母体血に比べて胎児血、新生児早期での血中 Kyn 濃度が高い機序とその意義については興味深い。何故ならば、胎児肝および胎盤では Trp のピロール環を開裂して N-formyl kynurenine となる反応を触媒する酸素添加酵素である tryptophan pyrrolase の活性は極めて低い²⁾からである。ちなみに N-formyl kynurenine から Kyn へは非酵素的反応で産生される。

最近、同じく Trp から N-formyl kynurenine になる反応を触媒する酵素として indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) が注目されている。成人で

はこの IDO は肺に最も活性が高いことが報告⁴⁾されているが、同じガス交換臓器である胎盤はその数倍高い。著者らは IDO のモノクローナル抗体を作成して、IDO が胎盤絨毛の syncytium 細胞に局在することを組織化学的に証明した⁸⁾。しかも、胎児肝には IDO 活性はほとんど認められなかつた。

このことから、胎児血中 Kyn 濃度が高いのは胎盤の IDO によるもので、生後は新生児肝の tryptophan pyrrolase の酵素誘導が起こり、血中 Kyn 濃度が維持されるものと考えられる。換言すれば、胎生期胎児肝の tryptophan pyrrolase が未熟であるため、胎盤の IDO が代償しているのではないかと思われる。何らかの意味で周生期には血中 Kyn 濃度を維持することが必要なのではないかと考えられる。Kyn は3-OHKyn, 3-OHAA を介して alanine あるいは NAD など補酵素として TCA サイクルと密接に関連しており、エネルギー産生に寄与しているものと推測される。実際著者らのデータでも、胎児血の3-OHAA 濃度は母体血の50～60倍の高値であつた。また、著者らは AFD 児に比べて、IUGR では臍帯血 Kyn 濃度が有意に低いことを報告⁹⁾しており、Kyn 代謝が胎児の発育に重要な役割を果たしているものと考えられる。一方、母体血に比べて臍帯血中の indole 系の代謝産物 ILA, IAA, IPA はいずれも有意に高値であつたが、現在のところこの意義は明らかではない。ただ、大腸癌の患者でこれら indole 系の代謝産物の血中濃度が高かつたという報告⁷⁾があり、細胞増殖や発育と何らかの関係があるのかも知れない。今後さらに検討する必要がある。

本研究は広島大学医学部総合薬学科、故吉田久信教授との共同研究であることを付記して、感謝の意を表する。

なお、本論文の要旨は第9回産婦人科栄養・代謝研究会(横浜)で発表した。

文 献

1. 江口勝人：IUGR とアミノ酸およびポリアミン代謝。産婦の世界，34：371, 1982.
2. 須川 信：Steroid Hormone の代謝調節作用とその妊娠成立・維持における意義。日産婦誌，22：825, 1970.
3. Curzon, G., Joseph, M.H. and Knott, P.J.: Effects of immobilization and food deprivation on rat brain tryptophan metabolism. J. Neuro-

- chem., 19: 1967, 1972.
4. *Fernstorm, J.D. and Wurtman, R.J.*: Brain serotonin content: Physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science*, 173: 149, 1971.
 5. *Fuller, R.W. and Roush, B.W.*: Binding of tryptophan to plasma proteins in several species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B: 273, 1973.
 6. *Gessa, G.L. and Tagliamonte, A.*: Possible role of free serum tryptophan in the control of brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Adv. Biochem. Psychopharmac.*, 11: 119, 1974.
 7. *Hill, M.J.*: Metabolic epidemiology of large bowel cancer. *Gastrointest. Cancer*, 18: 187, 1980.
 8. *Kamimura, S., Eguchi, K. and Sekiba, K.*: Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med. Okayama*, 45: 135, 1991.
 9. *Knott, P.J. and Curzon, G.*: Free tryptophan in plasma and brain tryptophan metabolism. *Nature*, 239: 452, 1972.
 10. *Lindblad, B.S. and Baldestem, A.*: The normal venous plasma free amino acid levels of non-pregnant women and of mother and child during delivery. *Acta Paediatr. Scand.*, 56: 37, 1967.
 11. *Morita, I., Kawamoto, M., Hattori, M., Eguchi, K., Sekiba, K. and Yoshida, H.*: Determination of tryptophan and its metabolites in human plasma and serum by high-performance liquid chromatography with automated sample clean-up system. *J. Chromatography*, 526: 367, 1990.
 12. *Morita, I., Masujima, T., Yoshida, H. and Imai, H.*: Studies on variation of tryptophan metabolites level in rabbit plasma with preparation procedures by high performance liquid chromatography. *Bunseki Kagaku*, 33: 235, 1984.
 13. *Perez-Cruet, J., Chase, T.N. and Murphy, D.L.*: Dietary regulation of brain tryptophan and neutral amino acids in humans. *Nature*, 248: 693, 1974.
 14. *Yamazaki, M., Kuroiwa, T., Takikawa, O. and Kido, R.*: Human indolylamine 2,3-dioxygenase. *Biochem. J.*, 230: 635, 1985.
 15. *Yoshida, H., Morita, I., Masujima, T. and Imai, H.*: A direct injection method of plasma samples onto a reverse phase column for the determination of drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, 30: 2287, 1982.
 16. *Zanardo, G., Bacolla, M., Biasiolo, G. and Allegri, G.*: Free and bound tryptophan in human milk during early lactation. *Biol. Neonate.*, 56: 57, 1989.

(No. 7169 平4・2・7受付)