

ストレス負荷による人尿中の γ -アミノ酪酸の変動について

山口 功・安藤 紀子・三田 禮造・苫米地孝之助

(昭和63年9月29日受理)

On the Fluctuation of Contents of γ -Aminobutyric Acid in Human Urine under Stressed Conditions

Isao YAMAGUCHI, Noriko ANDO, Reizo MITA and Konosuke TOMABECHI

(Received September 29, 1989)

緒 言

ヒトにストレスが荷かると副腎皮質ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、成長ホルモン、アドレナリン、インスリン、唾液腺ホルモンなどの適応ホルモンが分泌され、全身に防御反応が起こる。この反応はストレスに対する適応状態の獲得と維持に係わっている。これらのホルモンの分泌によって体内の代謝活動が活発となり、血中では血糖、グロブリン、アミノ酸、尿酸、ナトリウム、コレステロールやその他の脂質、予備アルカリなどが著しく増加し、またアルブミン、フィブリノゲン、乳酸、 α -ケト酸、ケトン体なども増減する。尿中においてもアミノ酸、尿酸、ナトリウムの増加が認められる。筋肉中ではグリコゲンの増減が見られる。

γ -アミノ酪酸は神経細胞膜のイオンチャンネルを拡張して塩素イオンを細胞内に導入する作用があり、このことにより神経細胞の電荷を中和させ神経の興奮状態を鎮めることが知られており、過度のストレスに対しては γ -アミノ酪酸は脳内のアミノブチルペプチドから生産されて、アンチストレスラーとしての働きをしているものと考えられる。生成した γ -アミノ酪酸は最終的には γ -アミノブチリルリシンか γ -アミノブチリルアルギニンとなって排泄される。従ってストレスの程度が大きいと尿中へのそれらの γ -アミノ酪酸複合体の排泄量も多いと考えられる。筆者らはストレス負荷をした被検者の旧尿を9日間採取し、加水分解の後、FT-NMRによって γ -アミノ酪酸の定量を行ない自覚症状との比較により若干の知見を得たのでここに報告する。

I 実験方法

(1) 測定機器

日立製R-90H型FT-NMR装置を使用した。

(2) 試薬

メルク社製重水、メルク社製3-トリメチルシリルプロピオン酸-d₅、和光純薬 γ -アミノ-n-酪酸などを用いた。

(3) 分析試料(尿)

分析試料である尿は国立栄養研究所内の被検者室に本学女子学生(年令21~22才)12名を宿泊させ、6名を1組として前半組、後半組に別け、それぞれに3日間ずつ表1に示したスケジュール表に従いストレスを負荷した。そして一定時間毎に採尿を繰返した。それらの一部ずつを採取した残りを集め1日尿(8:30~翌8:30)とした。その中から5mlを取り6N-塩酸0.1mlを加えて冷凍庫に保存した。分析に際しては解凍後、2N-塩酸1mlを加えて2時間加熱して加水分解し、0.45 μ mのセルロースアセテートフィルター(アドバンティク東洋社製)でろ過したものを測定試料とした。

A 検量線の作製

水5.0mlに試薬 γ -アミノ酪酸をそれぞれ0.01, 0.05, 0.1, 0.1mlと2-N塩酸1.0mlを加えて混合し、その中から0.8mlをとり、そして重水0.07mlを加えた溶液を直径5.0mmのNMR測定試料管中で調製してFT-NMR測定を行ない、0ppmの基準ピークの高さと2.51ppmに出る γ -アミノ酪酸の3-メチレントリプレットピークの中央ピークの高さの比を計算することにより検量線を作成した。なお重水中には3-トリメチルシリルプロピオン酸-d₅0.28gが重水79.78gに溶解させてある。FT-

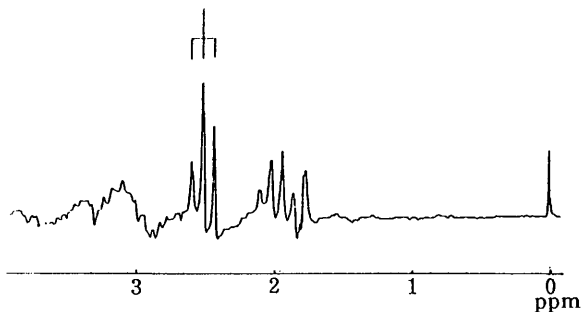


図1 酸性水溶液中での γ -アミノ酪酸の FT-NMRスペクトラム

NMR 測定は $^1\text{H}\cdot^9\text{F}$ 共用プローブおよびチューナーを使用し, homogated decoupling 法により252回積算させた。

B 分析試料中の γ -アミノ酪酸の定量

分析試料を加水分解した後, その中の1.0mlをマイクロシリンジで採取し, セルロースアセテートフィルター(0.45 μm)でろ過したろ液0.8mlを直径5.0mmの NMR 試料管に入れ, さらに検量線作製時に使用したマーカー入り重水0.07mlを加えてよく混和し, $^1\text{H}\cdot^9\text{F}$ 共用プローブおよびチューナー付の FT-NMR 装置で homogated decoupling 法により252回積算させた。そして γ -アミノ酪酸の3メチレントリプレットピーク(2.51ppm)と基準ピーク(0 ppm)との高さの比を計算し, その値を検量線に当てはめて, 被検者の1ml当りの尿中に含まれている加水分解して得た γ -アミノ酪酸の量(mg)

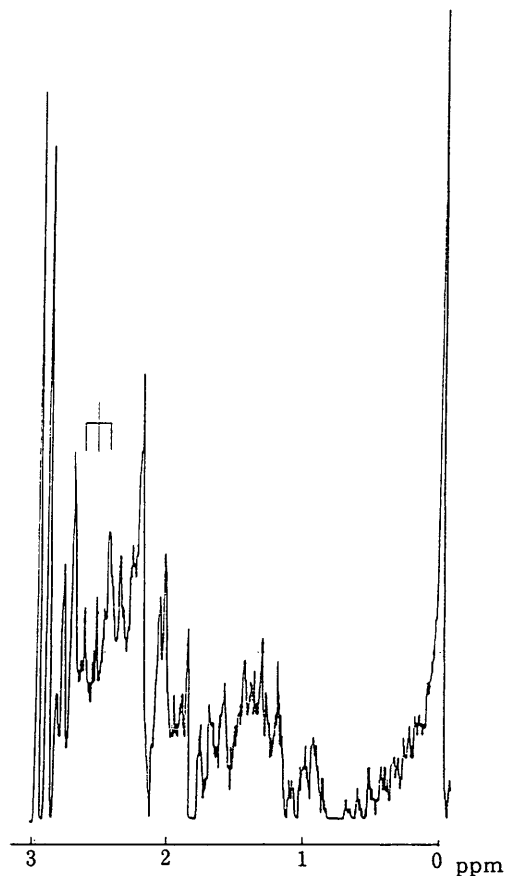


図2 人尿加水分解物の FT-NMR スペクトラム

表1 ストレス負荷スケジュール

被検者	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	8日目	9日目
① ②	環境 適 応 日	計 算	暗 黒	寒 冷	効 果 判 定 日	対 照 日			効 果 判 定 日
③ ④		寒 冷	計 算	暗 黒					
⑤ ⑥		暗 黒	寒 冷	計 算					
⑦ ⑧		対 照 日				計 算	暗 黒	寒 冷	
⑨ ⑩						寒 冷	計 算	暗 黒	
⑪ ⑫						暗 黒	寒 冷	計 算	

注：計算：小学校3年生用の計算トレーニング問題集を計算させる。監督者が採点して間違った箇所を訂正させる。(9:30~12:30と13:30~16:30)

寒冷：寒冷室(4℃)に防寒具を着せて着席させて放置する。(9:30~12:00と13:30~16:00)

暗黒：目隠しをさせて暗室に入れ無言で着席させておく。(9:30~12:30と13:30~16:30)

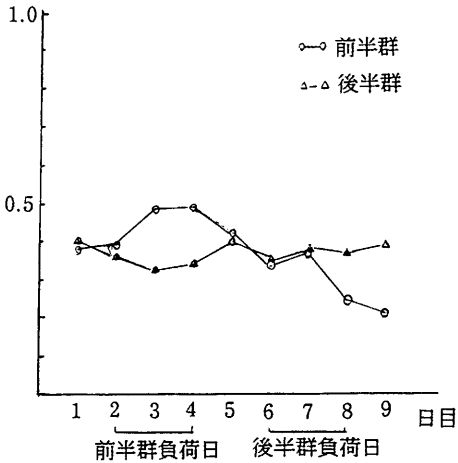


図3 身体的, 精神的, 神経的自覚症状総合平均値の推移

を割り出し, 各被検者の1日尿 (ml) を掛けることにより1日尿中に含まれている γ -アミノ酪酸の量 (mg) を算出した。尿中に γ -アミノ酪酸の試薬を加えてみると2.51ppmを中心としたピークが増すので, これを測定ピークとしても誤りでないことが解かる。

C 自覚症状調査

自覚症状調査は日本産業衛生協会の産業疲労研究会が作成した30項目についての身体的, 精神的, 神経的症状に関する調査表を用いて各項目を0~4の5段階で評価し, 1日2回朝と夜に行なったデータの平均値を取った。

III 結果および考察

自覚症状の推移は図3に示すように前半被検者群ではストレス負荷日に症状を訴えている。そして対照日や最終日に向けてその症状は改善されており, ストレス負荷がその通りに反映している。しかし後半被検者群では常にストレスが掛けられた状態で推移している。

1日尿中の γ -アミノ酪酸の排出量はこれらのストレス負荷に対して何らの相関性も示していない。しかし被検者の体内での γ -アミノ酪酸の代謝が前半群と後半群の両方に7日目に大きく行なわれている。このことは実験実施期間全体がストレスとなって被検者全員に係わり, 7日目がそのピークになっているのか, あるいはまた実験が後2日で終了するという心理的な要因で, γ -アミノ酪酸のこれまでの蓄積が不要となったための現象とも考えられる。これらの問題点に関しては今後の研究に待

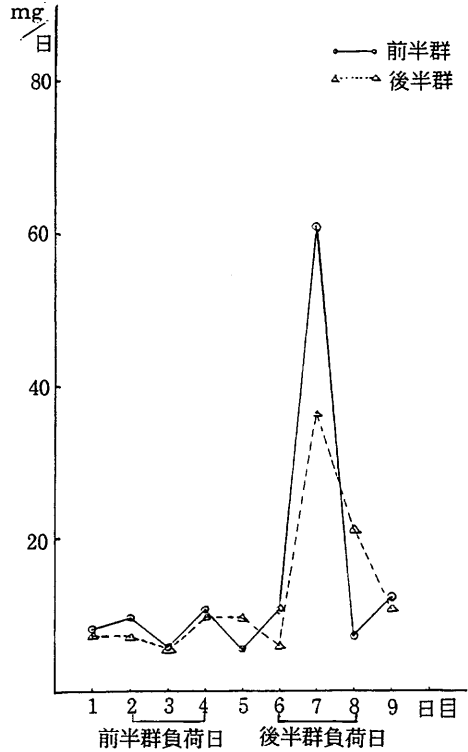


図4 24時間尿中の γ -アミノ酪酸の推移

つはかない。

III 文 献

- 1) 松下和弘, 吉川研一, 逢坂昭: 日本電子ニュース, 人尿の $^1\text{H-NMR}$, 21 (2), 6 (1981)
- 2) 山口修一: 日本電子ニュース, 尿の $^1\text{H-NMR}$ による先天性代謝異常症の診断, 26 (3), 16 (1986)

IV 謝 辞

この研究の遂行に当って本学卒論生の浅野由美子および中井つくり両氏の尽力を得たのでここに厚く感謝の意を表わすものである。

Summary

After their hydrolyses, the contents of γ -aminobutyric acid in human urine under stressed conditions were determined quantitatively by a FT-NMR spectroscopic method. On the seventh day in the experimental schedule, γ -aminobutyric acid was detected much more than it on other days, but there was no relationship between the fluctuation of contents of it and subjective symptoms of testees.