

D-アラニンの給餌がマウスおよびラットの血清生化学検査値および遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響

清水 栄人, 中川 航希, 平田 夏希, 老川 典夫,
細見 亮太[†], 福永 健治, 吉田 宗弘

(関西大学化学生命工学部生命・生物工学科*)

(受付 2019年8月28日, 受理 2019年9月30日)

Effects of Dietary D-Alanine on Biochemical Parameters and Free Amino Acid Concentration in serum of Mice and Rats

Eito SHIMIZU, Koki NAKAGAWA, Natsuki HIRATA, Tadao OIKAWA,

Ryota HOSOMI, Kenji FUKUNAGA, Munehiro YOSHIDA

Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University

Summary

Recent advances in analytical techniques have revealed that D-amino acids occur naturally and perform various physiological functions. However, in depth analysis of the physiological effects and potential health benefits of dietary D-amino acids has not been completed. This study investigated the effects of dietary D-alanine, which is present in relatively high concentrations in food, on several biochemical parameters including free amino acid concentration in the serum of mice and rats. Four-week-old male C57BL/6J mice and Wistar rats were each divided into three groups, with one group receiving a high-fat diet (Control) and the other two groups receiving diets containing 2% (w/w) L-alanine or D-alanine, respectively. After each group of mice and rats had been fed their corresponding diets for 42 or 28 days respectively, we collected their serum. These samples were used for biochemical analysis and the free amino acid concentrations were measured for each group. The D-alanine groups in both mice and rats had a significantly higher free D-alanine concentration than the Control and L-alanine groups. However, D-alanine did not affect the white adipose tissue weights and serum lipid parameters when compared with the Control or L-alanine groups in either mice or rats. Dietary D-alanine showed increased aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels compared with dietary L-alanine in mice, while the same was not observed in rats. As D-amino acid oxidase is not expressed in the liver of mice, this expression may explain the elevated AST and ALT levels we observed.

D-アミノ酸は、天然に多く存在するL-アミノ酸の光学異性体である。近年の分析技術の発達によって、哺乳類の生体内において、血液、副腎、脾臓、睾丸、小脳、脳下垂体にD-アミノ酸が遊離で存在する事が確認された¹⁾。さらに哺乳類から、D-アミノ酸ラセマーゼやD-アミノ酸酸化酵素(DAO)が発見され、生体内でのD-アミノ酸の生合成や分解機構も解明されつつある²⁾。最近では、腸内細菌により産生されたD-アミノ酸は、腸管のDAOによって分解され、その際に発生する過酸化水素が感染防御に役立っていることが報告されている³⁾。また、腸内細菌によってD-セリンが産生され、このD-セリンは、体内へ吸

収されて、急性腎障害に対する腎臓保護効果を示すことが報告されている⁴⁾。

一方、D-アミノ酸について、食品の二次機能に関する報告はあるが⁵⁾、食品の三次機能である生体調節機能に着目した研究は少ない。これまでに、ラットへのD-ヒスチジンの給餌は、抗肥満作用の1つである食欲抑制作用を示し、その作用はL-ヒスチジンの10分の1量で作用を示すことが報告されている⁶⁾。また、D-アスパラギン酸を多く含む食酢を2ヶ月間毎日ヒトが摂取することで、角層のD-アスパラギン酸量が有意に増加し、角層水分量も有意に増加することが報告されている⁷⁾。

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

†連絡先 (Corresponding Author), Tel: 06-6368-1765, E-mail: hryotan@kansai-u.ac.jp

多様な食品に D-アミノ酸が含まれていることが明らかにされており、とくに D-アミノ酸の中でも D-アラニンが多く含まれることが知られている⁸⁾。その理由の1つに、D-アラニンはペプチドグリカンの必須成分として細菌の細胞壁に含まれていることが関係している。その他に、アルファルファの種子 (*Medicago sativa* L.) 中のアラニンラセマーゼが D-アラニンの生成を触媒していることが報告されている⁹⁾。さらに、サワードウの発酵に乳酸菌と酵母を加えると、生地中に D-アラニンが生成される¹⁰⁾。果実 (リンゴ, ブドウ, オレンジ) および野菜 (キャベツ, 人参, ニンニク, トマト), ならびにこれらから調製されたジュースには、D-アラニンが含まれていることが報告されている^{11,12)}。そこで本研究では、D-アミノ酸の中でも多様な食品に含まれている D-アラニンに着目し、マウスおよびラットに L-および D-アラニンをそれぞれ高脂肪餌料に混合して給餌し、臓器重量, 血清生化学検査値および血清遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響を評価した。

実験方法

1. 餌料調製

L-アラニンおよび D-アラニンは、東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。餌料は、AIN-93G¹³⁾ 改変高脂肪餌料を Control 餌料とした。また、L-アラニンまたは D-アラニンが 2% (w/w) になるように Control 餌料からカゼインを減じて、それぞれ餌料 (L-Ala および D-Ala) を調製した。Table 1 に、これら 3 つの餌料の組成を示した。

2. 動物実験

本実験は関西大学実験動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号: 1820)。実験動物には 4 週齢雄性 C57BL/6J マウス (日本エスエルシー株式会社, 静岡) および Wistar/ST ラット (日本エスエルシー株式会社) を

用いた。各群 6 匹ずつ平均体重が同等になるように 3 群ずつに分けた。実験動物は室温 22°C ± 1°C, 明暗 12 時間サイクル (8:00 ~ 20:00) の条件下で飼育した。ポリカーボネート製のケージ 1 つあたりマウスは 3 匹ずつ, ラットは 2 匹ずつ収容した。実験餌料および水は自由摂取とし、マウスは 42 日間, ラットは 28 日間飼育した。飼育期間終了後、非絶食条件で 9 時 ~ 11 時の間に解剖を実施した。イソフルラン (共立製薬株式会社, 東京) による深麻酔下で下大静脈より採血し、肝臓, 腎臓および白色脂肪組織 (WAT) を採取し、重量を測定した。血清は、血液を 2,000 × g, 15 分間遠心分離して得た。得られた臓器は液体窒素にて急速凍結し、-80°C で保管した。

3. 血清生化学検査および遊離アミノ酸濃度の分析

血清の総蛋白, アルブミン, アルブミン/グロブリン比 (A/G 比), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), 尿素窒素 (SUN), クレアチニン, 総脂質, リン脂質 (PL), 中性脂肪 (TAG), 総コレステロール, 高密度リポ蛋白 (HDL)-コレステロール, Non-HDL-コレステロールの分析は日本医学株式会社 (大阪) に依頼した。

マウス血清中の D- および L-アミノ酸の濃度は、既報の方法¹⁴⁾ に従い試料中のアミノ酸を *o*-フタルアルデヒド/*N*-イソブチリル-L-システインでプレラベル蛍光誘導体化後、高速液体クロマトグラフィー (株式会社島津製作所, 京都) を用いて測定した。ラットの血清については、上記の方法で、D- および L-アラニンの濃度のみを分析した。測定は少なくとも 3 回繰り返し行った。

4. 統計処理

得られた測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。群間の差については、Tukey's multiple comparison test で検定を行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。また、血清 D-アラニン濃度と血清 AST および ALT 間の相関分析を行った。統計解析は GraphPad Prism ver. 7.0d (GraphPad Software, California, USA) を用いて行った。

結果と考察

マウスおよびラット試験ともに、飼育期間中の摂餌量, 摂水量および体重増加量は、各群間に有意な変化はみられなかった (data not shown)。Table 2 にマウスの終体重, 臓器重量および血清生化学検査値を示した。終体重, 肝臓, 腎臓, 精巣上体周囲 WAT, 腸間膜 WAT および腎臓周囲 WAT 重量は各群間に有意な変化は見られなかった。血清 PL 濃度において、L-Ala 群で D-Ala 群と比較して、有意に高値を示した。血清中の PL は、リポタンパク質に組み込まれている。リポタンパク質の中でも、HDL, 超低密度リポタンパク質 (VLDL) および低密度リポタンパク質 (LDL) は PL の占める割合が高い。そのため、L-Ala 群で

Table 1 Composition of the experimental diets

Ingredients	Groups		
	Control	L-Ala	D-Ala
	g/kg		
Casein	230	210	210
L-Alanine		20	
D-Alanine			20
Dextrinized corn starch	92.1	92.1	92.1
Corn starch	277.386	277.386	277.386
Sucrose	100	100	100
Cellulose	50	50	50
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
L-Cystine	3	3	3
AIN-93 vitamin mixture	10	10	10
AIN-93G mineral mixture	35	35	35
Soybean oil	30	30	30
Lard	170	170	170
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014

AIN, American Institute of Nutrition.

Table 2 Organs weights and serum biochemical parameters in mice

	Control	L-Ala	D-Ala
Final BW (g)	27.5 ± 0.7	26.1 ± 0.5	27.2 ± 0.4
Organ weights (g/100g BW)			
Liver	3.84 ± 0.14	3.90 ± 0.11	3.98 ± 0.06
Kidney	1.04 ± 0.06	1.13 ± 0.04	1.01 ± 0.04
Epididymal WAT	2.71 ± 0.31	2.89 ± 0.20	2.90 ± 0.32
Mesentery WAT	0.96 ± 0.17	1.06 ± 0.10	1.18 ± 0.17
Perirenal WAT	1.79 ± 0.11	1.83 ± 0.15	1.66 ± 0.12
Serum biochemical parameters			
Total-protein (g/dL)	4.66 ± 0.05	4.70 ± 0.03	4.63 ± 0.12
Albumin (g/dL)	2.74 ± 0.04	2.82 ± 0.02	2.77 ± 0.06
A/G	1.43 ± 0.04	1.49 ± 0.01	1.49 ± 0.04
AST (IU/L)	47.4 ± 7.7	41.2 ± 1.6	161.5 ± 61.3
ALT (IU/L)	18.4 ± 4.8	13.7 ± 0.8	113.8 ± 57.1
SUN (mg/dL)	28.0 ± 1.7	29.0 ± 1.0	29.5 ± 2.1
Creatinine (mg/dL)	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02
Total lipids (mg/dL)	406 ± 14	424 ± 8	401 ± 16
PL (mg/dL)	285 ± 4 ^{ab}	302 ± 5 ^b	283 ± 5 ^a
TAG (mg/dL)	54.0 ± 7.9	44.8 ± 3.6	47.8 ± 3.6
Total-cholesterol (mg/dL)	139 ± 4	152 ± 4	141 ± 8
HDL-cholesterol (mg/dL)	109 ± 3	116 ± 3	107 ± 6
Non-HDL-cholesterol (mg/dL)	30.4 ± 1.7	35.7 ± 2.0	33.5 ± 2.8

Data represent means ± SEM. Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test.

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase, A/G, albumin/globulin; BW, body weight; HDL, high density lipoprotein; PL, phospholipid, TAG, triacylglycerol; SUN, serum urea nitrogen; WAT, white adipose tissue.

認められた血清 PL 濃度の上昇には、血清中に HDL, VLDL および LDL 粒子が多く存在していることと関係があると考えられる。一方、D-Ala 群では、Control 群および L-Ala 群と比較して、血清 AST (それぞれ、 $p = 0.13$ および 0.09) および ALT 値 (それぞれ、 $p = 0.15$ および 0.11) が著しく上昇する傾向が認められた。血清総蛋白、アルブミン、A/G 比、SUN、クレアチニン、総脂質、TAG、総コレステロール、HDL-コレステロールおよび Non-HDL-コレステロール値は、各群間に有意な差はみられなかった。Table 3 にラットの終体重、臓器重量および血清生化学検査値を示した。終体重、肝臓、腎臓、精巣上体周囲 WAT、腸間膜 WAT および腎臓周囲 WAT 重量は各群間に有意な変化は認められなかった。血清総蛋白、アルブミン、A/G 比、AST、ALT、SUN、クレアチニン、総脂質、PL、TAG、総コレステロール、HDL-コレステロールおよび Non-HDL-コレステロール値は、各群間に有意な差はみられなかった。マウスに L-アラニンを経口投与した際に見られた血清 PL 濃度の増加は、ラットでは確認されなかった。また、マウスに D-アラニンを経口投与した場合に観察された血清 AST および ALT 値の上昇は、ラットでは見られなかった。マウスおよびラットともに D-アラニンの経口投与により、解剖時の WAT 重量や血清脂質濃度を変化させる効果はみられなかった。そのため、D-アラニンの摂取による生体調節機能を検討するためには、脂質代謝以外の代謝経路に及ぼす影響を評価する必要がある。

Fig. 1 にマウスの血清遊離アミノ酸濃度を示した。マウスの血清中グリシン、L 体のアラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンを測定したが、これらの項目には群間で有意な変化は観察されなかった。一方、血清 D-アラニン濃度は、D-Ala 群で他の 2 群と比較して有意に高値を示した。また、D-アミノ酸を給餌していない群においても、血清 D-アラニン、フェニルアラニンおよびセリンを検出した。Fig. 2 にラットの血清 L- および D-アラニン濃度を示した。マウスの血清遊離アミノ酸濃度の結果と同様に、L-アラニン濃度には各群間に有意な変化は見られず、一方、D-アラニン濃度は D-Ala 群で他群と比較して有意な上昇が見られた。

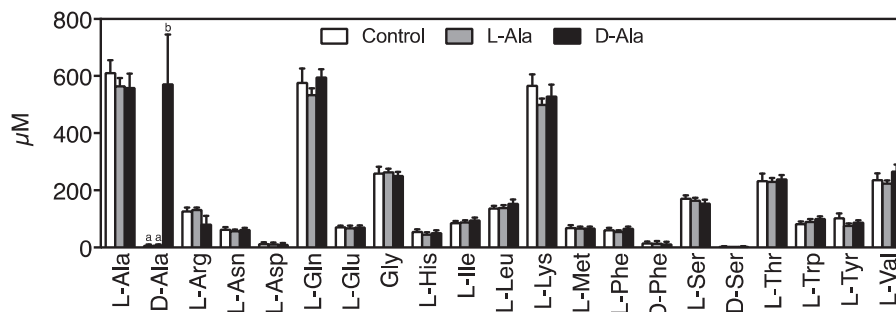
マウス試験において、D-Ala 群で他群と比較して肝機能指標である血清 AST および ALT 値が著しく高値を示す個体が認められた。また、血清 AST および ALT 値が高値を示した個体では、血清 D-アラニン濃度も高かった。そのため、マウスおよびラットの血清 D-アラニン濃度と血清 AST または ALT 値との相関を解析した (Fig. 3)。マウスにおいて、血清 D-アラニン濃度と血清 AST (Fig. 3A) または ALT (Fig. 3B) 値との間には、非常に高い相関が認められた。一方、ラットにおいては、血清 D-アラニン濃度と血清 AST (Fig. 3C) または ALT (Fig. 3D) 値と

Table 3 Organs weights and serum biochemical parameters in rat

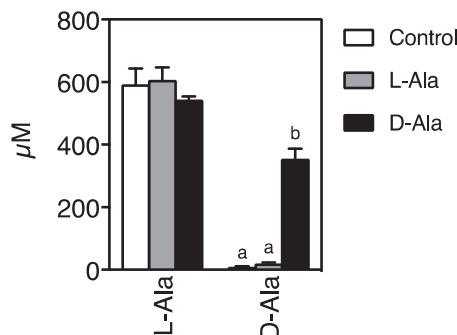
	Control	L-Ala	D-Ala
Final BW (g)	293 ± 7	293 ± 4	296 ± 4
Organ weights (g/100 g BW)			
Liver	3.85 ± 0.06	4.24 ± 0.22	3.97 ± 0.13
Kidney	0.66 ± 0.01	0.69 ± 0.02	0.70 ± 0.02
Epididymal WAT	1.45 ± 0.10	1.77 ± 0.17	1.37 ± 0.05
Mesentery WAT	1.43 ± 0.16	1.80 ± 0.26	1.32 ± 0.10
Perirenal WAT	1.06 ± 0.06	1.28 ± 0.14	1.28 ± 0.10
Serum biochemical parameters			
Total-protein (g/dL)	5.37 ± 0.07	5.37 ± 0.07	5.33 ± 0.05
Albumin (g/dL)	3.55 ± 0.06	3.45 ± 0.04	3.52 ± 0.05
A/G ratio	1.97 ± 0.1	1.81 ± 0.09	1.94 ± 0.06
AST (IU/L)	84.8 ± 3.1	86.8 ± 3.4	80.2 ± 2.0
ALT (IU/L)	48.7 ± 0.6	52.5 ± 3.1	56.2 ± 2.2
SUN (mg/dL)	13.7 ± 0.3	15.7 ± 1.4	16.7 ± 1.5
Creatinine (mg/dL)	0.19 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Total lipids (mg/dL)	271 ± 17	277 ± 25	262 ± 27
PL (mg/dL)	133 ± 4	136 ± 6	125 ± 3
TAG (mg/dL)	67.3 ± 10.7	67.8 ± 10.9	69.5 ± 19.1
Total-cholesterol (mg/dL)	74.3 ± 2.6	76.8 ± 4.2	69.5 ± 2.4
HDL-cholesterol (mg/dL)	53.2 ± 1.8	55.2 ± 3.1	49.8 ± 1.5
Non-HDL-cholesterol (mg/dL)	21.2 ± 0.9	21.7 ± 1.3	19.7 ± 1.0

Data represent means ± SEM.

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; A/G, albumin/globulin; BW, body weight; HDL, high density lipoprotein; PL, phospholipid; TAG, triacylglycerol; SUN, serum urea nitrogen; WAT, white adipose tissue.

**Fig. 1** Free amino acid compositions in the serum of mice

Data represent mean ± SEM. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test.

**Fig. 2** Free L- and D-alanine in the serum of rats

Data represent mean ± SEM. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test.

の間には、相関関係は認められなかった。これまでに、DAOが欠損した ddY マウスに D-アラニンを経口投与す

ると、血清、肝臓、腎臓および大脳の D-アラニン濃度が非常に高くなることが報告されている^{15,16}。さらにマウスでは、肝臓で DAO が発現していないことが報告されている^{17,18}。これらのことから、マウスでは給餌した D-アラニンの一部が肝臓に取り込まれるが、DAOによる分解が行われないと考えられる。そして、肝臓に蓄積された D-アラニンによって肝細胞を破壊されることで、血清 AST および ALT 値の高値につながっていることが推測される。また、マウス試験の D-Ala 群では、血清 AST および ALT 値の上昇が見られる個体と見られていない個体が混在している。これまでの研究から、体内に存在している D-アラニン含量は血漿よりも下垂体前葉と膵臓で高いことから、血液から組織への積極的な取り込みが行われていると考えられている¹⁹。本実験のマウス試験において、D-Ala 群の血清 D-アラニン濃度には大きなバラツキが見られた (575

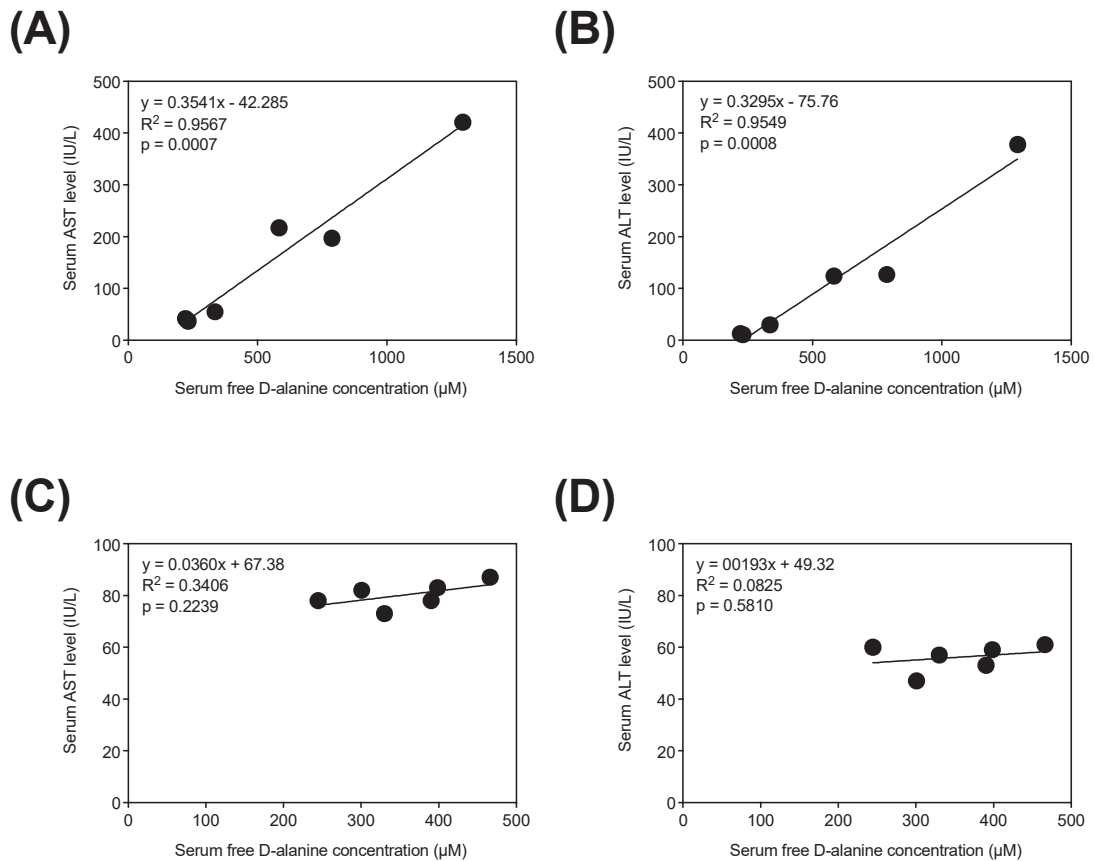


Fig. 3 The relationship between serum concentrations of D-alanine and serum AST level (A), D-alanine and serum ALT level (B) in D-Ala group of mice, and D-alanine and serum AST level (C), D-alanine and serum ALT level (D) in D-Ala fed rats.

±155 μM)。このように血清 AST および ALT 値の高値は血清 D-アラニン濃度が高い場合にのみ観察されることと、齧歯類の血清 AST および ALT の半減期がそれぞれ 1.6 時間および 3-4 時間²⁰⁾であることから考えると、D-アラニンによる肝細胞の破壊は、血清 D-アラニン濃度が高い場合にのみ見られる一過性の現象であると推測される。今後、肝臓中の D-アラニン濃度や AST, ALT 活性を分析して、より詳細に D-アラニンがマウスの肝細胞へ及ぼす影響について明らかにしていく必要がある。

本実験では、D-アラニンを高脂肪餌料に混合した餌料をマウスおよびラットに与え、血清生化学検査値および遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響を検討した。本実験条件では、D-アラニンの給餌による血清脂質濃度改善効果はみられなかった。またマウスにおいて、D-アラニンを給餌した群において、血清 AST および ALT 値の上昇が見られた。これは、マウスでは肝臓において DAO が発現していないことが原因と考えられ、肝臓で DAO が発現しているラットでは血清 AST および ALT 値の上昇はみられなかった。また本実験でマウスおよびラットに給餌した餌料中の D-アラニン濃度は、2% (w/w) すなわち約 0.2 M 相当であり、一般に食品に含まれている D-アラニン濃度 ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M) と比較して 200 ~ 20,000 倍であり、またヒトには肝臓にラットと同様 DAO が発現し D-アラニンを分解、あるいは尿中にそのまま D-アラニンは移行し体外に

排泄される²¹⁾ ことなどから、食品中の D-アラニンがヒトの肝臓にマウスと同様の影響を与えることはないと考えられる。

本実験の結果から、餌料中の D-アミノ酸の体内動態は、実験動物種によって異なることが明らかとなったことから、今後、本実験に用いる実験動物種の選択を含めた実験条件の再検討、または他の代謝経路に着目することで、D-アラニンの摂取による生体調節機能の評価を実施し、ヒトに対する D-アラニンの新たな生理的機能を解明していく予定である。

謝 辞

本研究は、「関西大学先端科学技術推進機構研究グループ予算 (機能性食品開発)」および「関西大学研究拠点形成支援経費 (課題名: D-アミノ酸を新たな生物系素材とする新規機能性食品開発拠点の形成)」の援助により実施したものである。

参考文献

- 1) Grishin DV, Zhdanov DD, Pokrovskaya MV, Sokolov NN (2019) D-amino acids in nature, agriculture and biomedicine, *Front Life Sci* DOI:

- 2) Koga R, Miyoshi Y, Sakaue H, Hamase K, Konno R (2017) Mouse D-amino-acid oxidase: distribution and physiological substrates. *Front Mol Biosci* 4: 82.
- 3) Sasabe J, Miyoshi Y, Rakoff-Nahoum S, Zhang T, Mita M, Davis BM, Hamase K, Waldor MK (2016) Interplay between microbial D-amino acids and host D-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. *Nat Microbiol* 1: 16125.
- 4) Nakade Y, Iwata Y, Furuichi K, Mita M, Hamase K, Konno R, Miyake T, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Miyagawa T, Hara A, Shimizu M, Kamikawa Y, Sato K, Oshima M, Yoneda-Nakagawa S, Yamamura Y, Kaneko S, Miyamoto T, Katane M, Homma H, Morita H, Suda W, Hattori M, Wada T (2018) Gut microbiota-derived D-serine protects against acute kidney injury. *JCI Insight* 3: 97957.
- 5) Okada K, Gogami Y, Oikawa T (2013) Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake. *Amino Acids* 44: 489-498.
- 6) 山本祐司 (2007) D型アミノ酸の生体内における生理機能の解析. 平成17年度浦上財団研究報告書15: 33-42.
- 7) 三田真史, 浜瀬健司 (2011) 皮膚におけるD-アミノ酸の存在とその生理活性. *Bio Industry* 28: 40-44.
- 8) Friedman M (2010) Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chem Biodivers* 7: 1491-1530.
- 9) Ono K, Yanagida K, Oikawa T, Ogawa T, Soda K (2006) Alanine racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): first evidence for the presence of an amino acid racemase in plants. *Phytochemistry* 67: 856-860.
- 10) Gobbetti M, Simonetti M.S, Rossi J, Cossignani L, Corsetti A, Damiani P (1994) Free D- and L-amino acid evolution during sourdough fermentation and baking. *J Food Sci* 59: 881-884.
- 11) Cavani L, Ciavatta C, Gessa C (2003) Determination of free L- and D-alanine in hydrolysed protein fer-tilisers by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 985: 463-469.
- 12) Gandolfi I, Palla G, Marchelli R, Dossena A, Puelli S, Salvadori C (1994) D-alanine in fruit juices: a molecular marker of bacterial activity, heat treatments and shelf-life. *J Food Sci* 59: 152-154.
- 13) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
- 14) Brückner H, Jaek P, Langer M, Godel H (1992) Liquid chromatographic determination of D-amino acids in cheese and cow milk. Implication of starter cultures, amino acid racemases, and rumen microorganisms on formation, and nutritional considerations. *Amino Acids* 6: 205-211.
- 15) Nagata Y, Shimojo T, Akino T (1988) D-amino acid oxidase in mouse liver-II. *Comp Biochem Physiol B* 91: 503-504.
- 16) Morikawa A, Hamase K, Inoue T, Konno R, Niwa A, Zaito K (2001) Determination of free D-aspartic acid, D-serine and D-alanine in the brain of mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 757: 119-125.
- 17) Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H (2013) A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Commun* 4: 1366.
- 18) Xin YF, Li X, Hao B, Gong N, Sun WQ, Konno R, Wang YX (2010) Indispensable but insufficient role of renal D-amino acid oxidase in chiral inversion of NG-nitro-D-arginine. *Chem Biodivers* 7: 1413-1423.
- 19) 浜瀬健司, 財津潔 (2004) 哺乳類体内微量D-アミノ酸の選択的分析法の開発. *分析化学* 53: 677-690.
- 20) Boyd JW (1983) The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals. *Vet Clin Pathol* 12: 9-24.
- 21) Brückner H, Haasmann S (1994) Quantification of D-amino acids in human urine using GC-MS and HPLC. *Amino Acids* 6:205-211.