



Title	Thiamine欠乏動物に関する薬理学的研究
Author(s)	西川, 殷維
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27721
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Thiamine 欠乏動物に関する

薬理学的研究

西川 殷 維

目 録

緒 言	1
本 論	3
第1章 Thiamine 欠乏動物組織内 catecholamine 含量.....	3
第1節 Thiamine 欠乏ラット組織内 catecholamine 含量の増加 (Noradrenaline および adrenaline の 分別定量)	5
1) Thiamine 欠乏ラット組織内蛋白含量	8
2) Thiamine 欠乏ラット組織重量	9
第2節 Thiamine 欠乏ラット組織内 serotonin 含量.....	10
第3節 組織内 catecholamine 含量と pyruvic acid 含量の変動について	11
第1章の総括と考察	13
小 括	15
第2章 Thiamine 欠乏動物組織内 catecholamine 含量の 増加機作.....	17
第1節 Thiamine 欠乏ラットの monoamine oxidase 活性.....	17
第2節 Thiamine 欠乏ラットの catechol-O-methyltrans- ferase 活性	20
第3節 Thiamine 欠乏ラット血液中 catecholamine 含量	21
第4節 Thiamine 欠乏ラット組織内 catecholamine の 合成能	22
第2章の総括と考察	25
小 括	26

第3章	Thiamine 欠乏動物組織内 catecholamine の turnover rate の低下の生理学的意義ならびに増加した catecholamine の存在部位とその性質	28
第1節	Thiamine 欠乏ラットの血圧	28
第2節	Thiamine 欠乏ラットの心拍数	31
第3節	Reserpine , tyramine , dl-amphetamine 投与による catecholamine の変動と behavior	34
第4節	Thiamine 欠乏ラットの insulin shock 抵抗性	39
第3章の総括と考察		42
小 括		46
第4章	遊離型 thiamine からエステル型 thiamine への促進因子について	48
第1節	Thiamine 欠乏ラット組織内 thiamine 含量	48
第2節	Insulin の作用	51
第3節	Tyramine , dl-amphetamine の作用	53
第4章の総括と考察		56
小 括		59
第5章	Insulin の組織内 catecholamine の turnover rate 促進作用	61
第5章の総括と考察		65
小 括		67
結 論		69
参考文献		70

緒

言

1897年Eijkman¹⁾がニワトリを白米食で飼育すると多発性神経炎をおこすことを認め、以来、vitamin B₁ (thiamine) に関する栄養学、生化学ならびに衛生化学的研究は長足の進歩をとげた。Thiamineの生体内における役割については、これが生体内でピロリン酸エステルとなり、いわゆる de-carboxylaseの補酵素として、ピルビン酸や α -ケトグルタル酸の脱炭酸に関与しているほか、五炭糖リン酸サイクルにおいて、transketolaseの補酵素としての役割が知られている。しかし thiamine 欠乏症に関しては、thiamineの補酵素としての役割の欠如であるという見解の域を脱しなかった。

Thiamine欠乏により起る多発性神経炎、脚気、自律神経障害並びに運動神経障害を、この補酵素としての作用のみからでは説明することが出来ない。

1945年 von Muralt^{2, 3)}は thiamine が補酵素としての役割以外に、末梢神経ならびにおそらくは中枢神経系において、神経の刺激伝達機構に何らかの役割を演じていることを示唆し、その後これを支持する研究が二、三なされた。⁴⁻⁷⁾ が前述の欠乏時の症状との関連性はなお不明である。

Thiamine 欠乏に関する薬理学的な研究は、ほとんど進展をみず、上述の神経伝達における役割以外に、thiamine と acetylcholine との関係ならびに cholinergic機能との関連性について行なわれたが、⁸⁻¹¹⁾ その生化学的レベルにおける明確な相互関係は確認されていない。一方 thiamine の adrenergic機能における役割については、¹²⁾ ほとんど研究報告がない。

1965年岩田¹³⁾は thiamine が神経系において果たす役割を解明すべく実験を行ない、thiamine 欠乏動物の摘出心臓の tyramine に対する感受性が増強されていることを認めた。このことに端を発し、各組織内の catecholamine (CA) を定量したところ、大脳皮質、心房、心室、脾臓等の臓器内において著るしく増加していることを認めた。

これらのことから著者は、thiamineが神経系とくに交感神経系で果す役割をその代謝機能との関連において解明せんとして本研究に着手した。

本 論

第1章 Thiamine 欠乏動物組織内 Catecholamine 含量

実 験 動 物 作 成

実験動物として、体重 80~100g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。Thiamine 欠乏合成飼料として第1表のごとき組成を用いた。欠乏飼料 1kg につき 3mg の thiamine HCl を添加して飼育した対照群と、thiamine 添加飼料の摂食量を制限し、欠乏群と同じ体重曲線を描かせた pair-fed (calorie restricted) 群を作成した。飼育にあたっては、動物を別々に飼育し、食糞による thiamine の摂取を避けた。

Table 1.

Thiamine deficient basal diet for rat

Vitamin free casein	20 g
Soy bean oil	9
Cod liver oil	1
McCullum's salt	4
Sucrose	64.6
Vitamin solution	1 ml
Choline chloride	0.1g
DL-Methionine	0.3

Vitamin solution

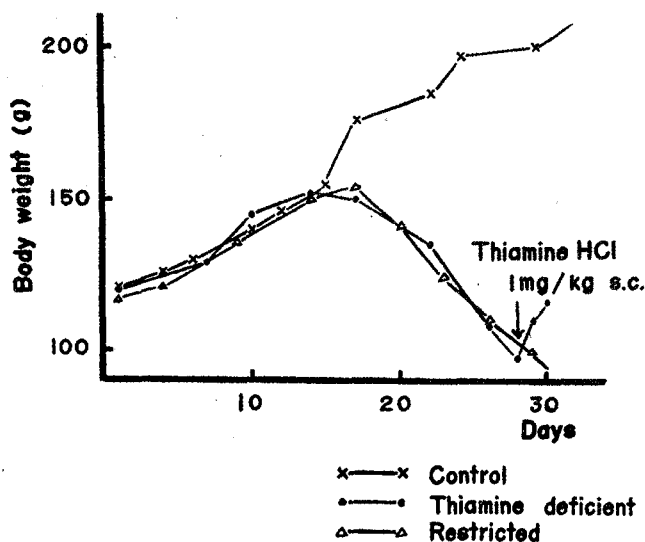
	mg		mg
Riboflavin	40	Calcium	
Pyridoxine HCl	30	pantothenate	400
Cyanocobalamin	3	Inositol	1000
Ascorbic acid	2000	p-Aminobenzoic acid	1000
Menadione	50	Folic acid	20
Nicotinic acid	400	Biotin	4

50% ethanol ad 100 ml

Thiamine 欠乏の指標として、著者は、ラット徐脈の発現とその進展について検討した結果、対照群の70%以下に減少しはじめると、その後の減少が比較的確実に進行することから、この点を指標とし、以下の実験に thiamine 欠乏群として用いた。

なおこの合成 thiamine 欠乏飼料で飼育した場合、体重は飼育開始後12日目頃までは対照群と変わりなく増加するが、その後は増加の停止に引続き減少しはじめ、末期になると1日の体重減少は10g以上におよぶ。その間、運動量の減少、体重減少、立毛、徐脈、痙攣、振顫、旋回などの症状を伴った重症の多発性神経炎が起る。飼育開始後4週末または5週目に死の転帰をとる(第1図)。

Fig. 1. Body weight during thiamine deficient feeding



第一節 Thiamine 欠乏ラット組織内 Catecholamine 含量の増加 (Noradrenaline および adrenaline の分別定量)

CA は生体内の各臓器に広く分布し、哺乳動物では、adrenalin (A) は主として副腎髄質に、noradrenaline (NA) は副腎髄質のほか交感神経支配臓器に多く分布されており、副腎髄質では分泌ホルモンとして、また交感神経支配臓器では神経末端での刺激伝達物質として、それぞれ生理的に重要な役割を果たしていることはよく知られている。そこで thiamine 欠乏で増加した CA が NA であるか、A であるかを検討すべく CA の分別定量を行なった。

実験材料および方法

実験は、thiamine 欠乏群、対照群、pair fed 群の 3 群に分けて行なった。動物を断頭し、0.4N の KClO_4 で homogenize し、全液をビーカーに取り、一夜アイス・ストッカー内で凍結させた。凍結後融解させ、組織内の CA を抽出した。CA の定量は、Crout¹⁴⁾の方法に従い、CA を KCO_3 でアルミナに吸着させ (pH 8.2-8.4)、0.2M CH_3COOH で溶出して精製し、この精製抽出液で、酸化法¹⁵⁾による NA と A の分別定量ならびにフィルター法¹⁶⁾による分別定量を行なった。

酸化法による NA と A の分別定量は試験管 [A] に sample 1 ml と 1M acetate buffer (pH 3.5) を 2 ml、試験管 [B] に 1M acetate buffer (pH 6.0) を 2 ml 加え正確に 3 分後、ascorbic acid を 20% NaOH 溶液に 0.2% の濃度に溶解したものを添加し、trihydroxyindole となし¹⁷⁾ NA と A を蛍光定量した。励起波長 405 $m\mu$ 、蛍光波長 515 $m\mu$ で得られた試験管 [A] と試験管 [B] の測定値より、次式に従って NA 含量ならびに A 含量を算出した。

計 算 式

$$NA = \frac{a(A-B)}{100-n}$$

$$A = \frac{a(B-F)}{100m} - \frac{n \cdot y}{100m}$$

A : pH 6.0 の蛍光光度計の読み

B : pH 3.5 の蛍光光度計の読み

F : エキス・プランクの蛍光光度計の読み

a : 用いた A の μg

m : A / NA の蛍光強度の比率

n : pH 3.5 で酸化された NA の比率

フィルター法による分別定量は、sample 1ml に 1M acetate buffer (pH 6.0) 2ml を加え、前述と同じ方法で trihydroxyindole と ¹⁷、励起波長に 375 $m\mu$ と 402 $m\mu$ を、蛍光波長には 537 $m\mu$ を選んで、次の計算により NA と A の分別定量を行なった。

計 算 式

$$X + Y = F$$

$$V_2/V_1 \cdot X + W_2/W_1 \cdot Y = f$$

F : 励起波長 375 $m\mu$ で測定した蛍光値

f : 励起波長 402 $m\mu$ で測定した蛍光値

V₁ : A を 375 $m\mu$ で測定した蛍光値

V₂ : A を 402 $m\mu$ で測定した蛍光値

W₁ : NA を 375 $m\mu$ で測定した蛍光値

W₂ : NA を 402 $m\mu$ で測定した蛍光値

X : 混合液中の A の蛍光値

Y : 混合液中のNAの螢光値

酸化法ならびにフィルター法で得られたNA、A量を平均することによりNA、A含量を分別定量した。

実 験 成 績

Thiamine 欠乏動物ならびに対照動物組織内NA量およびA量を第2表に示す。第2表から明らかなように、thiamine 欠乏で増加したCAは全組織内において、主としてNAであり、心房、心室においては、NAの増加とともにAの増加も認められた。また対照群、欠乏群ともに、大脳皮質、脳幹、脾臓等の臓器においては、NAのみが存在し、Aは検出されなかった。次いで、thiamine 欠乏動物に4 mg/kgのthiamine HClを皮下投与し、5時間後にNA、Aを測定したが、未処置欠乏群とほとんど同じ含量を示し、正常値への回復はみられなかった。

Table 2. Katecholamingehalt in Geweben von Ratten unter Thiaminmangel ($\mu\text{g/g}$)

		Kontrolle ^a		Thiaminmangelfutter		Thiamininjektion ^b	
		Noradrenalin	Adrenalin	Noradrenalin	Adrenalin	Noradrenalin	Adrenalin
Herz	Vorhof	1,31 $\pm$ 0,14 (7)	0,39 $\pm$ 0,19 (7)	2,65 $\pm$ 0,37 (6) ^c	0,43 $\pm$ 0,17 (6)	2,49 $\pm$ 0,46 (5)	0,48 $\pm$ 0,19 (5)
	Ventrikel	0,21 $\pm$ 0,09 (7)	0,07 $\pm$ 0,02 (7)	0,51 $\pm$ 0,15 (6) ^c	0,29 $\pm$ 0,14 (6) ^c	0,48 $\pm$ 0,19 (6)	0,26 $\pm$ 0,11 (5)
Gehirn	Rinde	0,26 $\pm$ 0,04 (7)	0	0,49 $\pm$ 0,07 (5) ^c	0	0,47 $\pm$ 0,09 (5)	0
	Stamm	0,58 $\pm$ 0,09 (7)	0	0,64 $\pm$ 0,09 (5)	0	0,65 $\pm$ 0,11 (5)	0
Nebenniere		508,7 $\pm$ 49,3 (7)	62,37 $\pm$ 5,95 (7)	517,6 $\pm$ 44,7 (5)	69,85 $\pm$ 7,85 (5)	509,4 $\pm$ 67,2 (5)	59,9 $\pm$ 6,85 (5)
Milz		0,40 $\pm$ 0,03 (7)	0	1,21 $\pm$ 0,13 (5) ^c	0	1,23 $\pm$ 0,12 (5)	0

^a 3 mg Thiamin-HCl in 1 kg Thiaminmangel-Grundfutter. ^b Thiamin-HCl 4 mg/kg s.c. ^c Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$). Ziffer: Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler. Anzahl der Gruppen in Klammern. Pro Gruppe 3-4 Ratten.

1) Thiamine 欠乏ラット組織内蛋白含量

Thiamine欠乏ラット上記新鮮組織gあたりのCA (NAおよびA)含量は著明に増加することが認められたが、更に組織蛋白あたりのCA含量についても検討すべく実験を行なった。

実験材料および方法

組織蛋白の定量は、組織の homogenate を1NのNaOHで加熱溶解し、Lowry¹⁸⁾の方法により測定した。

実験成績

Thiamine 欠乏動物の組織蛋白含量は、対照群のそれに比較して、肝臓において増加がみられたが、他の全ての組織において、有意な変化は認めなかった(第3表)。

Table 3. Protein contents in tissues of thiamine deficient rat (μg/g)

	Heart		Brain		Adrenal gland	Spleen	Liver
	Atrium	Ventricle	Stem	Cortex			
Control	0.14 ±0.03	0.24 ⁽⁵⁾ ±0.06	0.15 ⁽⁵⁾ ±0.04	0.17 ⁽⁵⁾ ±0.02	0.14 ⁽⁵⁾ ±0.01	0.24 ⁽⁵⁾ ±0.06	0.15 ⁽⁵⁾ ±0.01
Thiamine deficient	0.17 ⁽⁵⁾ ±0.06	0.26 ⁽⁵⁾ ±0.03	0.13 ⁽⁵⁾ ±0.02	0.16 ⁽⁵⁾ ±0.02	0.20 ⁽⁵⁾ ±0.03	0.28 ⁽⁴⁾ ±0.05	0.30* ⁽⁵⁾ ±0.04

*P<0.01 when compared with control value.

The values are mean ±S.E..

Number of groups are in parenthesis.

2) Thiamine 欠乏ラットの組織重量

欠乏群の組織 g あたりの CA 含量の増加は、組織重量の減少に起因するとも考えられることから、組織重量を測定した。

実験材料および方法

欠乏群、対照群、ならびに pair fed群を断頭し、出来るだけ血液を多く出し、後すみやかに臓器を摘出し、更に血液成分を組織から取り除き、秤量した。

実験成績

欠乏群の各臓器重量を測定すると、脾臓の場合、重量が対照群に比し、著明な減少を示し、pair fed群の脾臓においても、欠乏群同様、著るしい重量の減少を示した。欠乏群の臓器重量の減少は脾臓のほか、睪丸においても著明であり、pair fed群においては、脾臓の他、肝臓および睪丸において重量の減少が認められた(第4表)。

Table 4. Weights of tissues in the thiamine deficient rat (g)

	Heart	Brain	Adrenal gland	Spleen	Liver	Kidney	Testis
Control*	0.71 ±0.02 (7)	1.42 ±0.02 (7)	0.025 ±0.003 (7)	0.76 ±0.09 (7)	6.67 ±0.38 (5)	0.65 ±0.01 (5)	1.06 ±0.03 (5)
Thiamine deficient	0.58 ±0.05 (7)	1.38 ±0.05 (7)	0.025 ±0.004 (7)	0.26 ±0.08 (7)	7.02 ±0.32 (5)	0.69 ±0.04 (5)	0.66 ±0.05 (5)
Restricted	0.45 ±0.02 (7)	1.27 ±0.04 (7)	0.013 ±0.001 (7)	0.26 ±0.07 (7)	3.56 ±0.56 (5)	0.63 ±0.11 (5)	0.84 ±0.15 (5)

*3mg of thiamine HCl in 1kg of thiamine deficient basal diet

The values are mean ±s.e..

Number of rats are in parenthesis.

第二節 Thiamine 欠乏ラット組織内 serotonin 含量

Thiamine欠乏で組織内に著明にCAが増加することを認めたが、CAとともに生体アミンであり、同じ分解酵素系を持つserotonin含量についても検討を加えた。

実験材料および方法

対照群ならびに欠乏群を断頭し、すみやかに臓器を摘出し、組織内serotonin含量をBogdanski¹⁹⁾の方法ならびにUdenfriend²⁰⁾の方法に従い以下の順に定量した。

組織1~2gを2倍量の0.1NHClでhomogenizeし、無水炭酸ソーダを加えてpHを10とし、5mlのborate buffer (pH10)および水を加えて総量を15mlとし、この溶液に食塩7gおよびn-butanol 20mlを加え振盪遠沈し、後水層を除く。有機層を15mlのborate bufferと振盪遠沈し、butanol層10mlを他の共栓付遠沈管にうつす。これに15mlのn-heptaneおよび2.5mlの0.1NHClを加え振盪遠沈する。水層2mlを取り、これにconc.HCl 0.8mlを加え、直ちに295m μ の励起波長、550m μ の蛍光波長で蛍光強度を測定した。

実験成績

Thiamine欠乏動物のserotonin含量は、大脳皮質、脳幹においては、CAの場合と比較すると、軽度ではあるが増加することが、また脾臓の場合は、CAの場合と同様、著明に増加することが認められた。一方欠乏群の小腸においては逆に減少することが認められた(第5表)。

Table 5.

Serotonin content in tissues of thiamine deficient rat
($\mu\text{g/g}$) or ($\mu\text{g/ml}$)

	Control	Thiamine deficient
Brain cortex	0.25 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.04
Brain stem	0.51 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.07
Spleen	1.77 $\pm$ 0.18	3.88 $\pm$ 0.41
Small intestine	4.13 $\pm$ 0.29	2.99 $\pm$ 0.27
Blood	1.11 $\pm$ 0.19	0.88 $\pm$ 0.07

第三節 組織内 Catecholamine 含量と
pyruvic acid 含量の変動に
ついて

Thiamine 欠乏では、cocarboxylase としての作用減弱の結果、組織内での pyruvic acid の異常蓄積が考えられる。Thiamine 欠乏でみられた CA の著大な増加と組織内 pyruvic acid の変動との間に何らかの関係がある可能性も考えられることから、欠乏群の組織内 pyruvic acid 含量ならびに対照ラットに pyruvic acid を長期間連続投与した際の CA 含量を測定し、組織内 CA 含量と pyruvic acid 含量の変動について検討を加えた。

実験材料および方法

1. 組織内 pyruvic acid の定量

動物を断頭後、直ちに脳、心臓、脾臓、肝臓を摘出し、脳は大腦皮質、脳幹、小脳に分け、氷冷下、蒸留水で homogenate とし、10% メタ燐酸を加え、煮沸水浴中に7分間放置し、除蛋白する。この上清に 2, 4-dinitro-phenylhydrazine を加え抽出 pyruvic acid を hydrazone 化した後、ethylacetate で抽出し、下層を除き、上層に同量の ligroine を加えた後、0.1 N Na_2CO_3 で抽出転溶し、上層を除き同量の 2 N NaOH を加えて生じる赤色を $417 m\mu$ で比色定量した。

2. 組織内 CA の定量

組織内 CA の定量は、組織内の CA を第一節で述べた方法で抽出し、Crout¹⁴⁾ の方法に従い、CA を K_2CO_3 でアルミナに吸着させ、0.2 M CH_3COOH で溶出精製し、この精製液を Euler¹⁷⁾ のフェリシアン化カリウム酸化 (pH 6.3) による trihydroxyindole 法で測定した。

実験成績

Thiamine 欠乏動物の pyruvic acid 含量は、第6表に示すごとく、对照群と比較して、小脳、心臓、肝臓、脾臓においては著明な増加が認められた。また欠乏動物に 4.0 mg/Kg の thiamine HCl を皮下投与すると、脾臓を除く全ての組織において、5時間後には正常値に回復していた (第6表)。また欠乏動物での CA の著明な蓄積は、組織内 pyruvic acid の異常蓄積によるものとも考えられることから、对照動物に sodium pyruvate (300 mg/Kg) を1日2回、30日間連続腹腔内に投与し組織内の CA 含量を測定した。Sodium pyruvate 処置動物の脳幹、心室、脾臓等の臓器において減少し、さらに副腎においては著明に減少していた (第7表)。

Table 6. Brenztraubensäuregehalt in Geweben von Ratten unter Thiaminmangel (μg/g)

		Kontrolle ^a	Thiaminmangelfutter	Thiamininjektion ^b
Herz	Ventrikel	17,28 ± 3,67 (7)	26,37 ± 0,84 (7) ^c	18,91 ± 1,86 (7) ^d
Gehirn	Rinde	7,82 ± 0,61 (4)	9,93 ± 1,06 (4) ^c	8,35 ± 0,72 (5) ^d
	Stamm	11,24 ± 0,83 (4)	14,26 ± 1,20 (4)	10,56 ± 1,92 (5)
	Kleinhirn	10,25 ± 2,38 (4)	15,96 ± 2,38 (4) ^c	11,96 ± 0,94 (5) ^d
Milz		20,93 ± 1,57 (5)	33,98 ± 4,79 (5) ^c	45,29 ± 8,65 (5) ^{c,d}
Leber		14,65 ± 1,95 (5)	24,39 ± 1,90 (5) ^c	16,95 ± 2,16 (5) ^d

^a 3 mg Thiamin-HCl in 1 kg Thiaminmangel-Grundfutter. ^b Thiamin-HCl 4 mg/kg s.c. ^c Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$). ^d Signifikanter Unterschied zur Thiaminmangelfutter-Gruppe ($P < 0,05$). Ziffer: Mittelwert ± mittlerer Fehler. Anzahl der Gruppen in Klammern.

Table 7.

Catecholamine content in tissues of control rat treated with sodium pyruvate (μg/g)

	Control	PyA-Na
Brain cortex	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.07
Brain stem	0.58 ± 0.09	0.42 ± 0.04
Heart atrium	1.31 ± 0.14	1.55 ± 0.15
Heart ventricle	0.34 ± 0.12	0.21 ± 0.03
Spleen	0.40 ± 0.03	0.22 ± 0.04
Adrenal gland	582.3 ± 62.8	381.1 ± 31.0

Sodium pyruvate : 300mg/kgx60/30 days i.p.

第 1 章 の 総 括 と 考 察

さきに岩田¹³⁾が認めた thiamine 欠乏動物の大脳皮質、心房、心室、脾臓等の臓器において増加したCAがNAであるかAであるかを検討すべくCAの

分別定量を行なった結果、thiamine欠乏で増加したCAは主としてNAであった。また心房、心室においては、NAの増加とともにAの増加も認められた。

この組織gあたりのCAの増加は、組織内蛋白あたりについてもあてはまることを明確にした。次に臓器重量との関係について検討を加える目的で各臓器重量を測定した。脾臓の場合、欠乏群では、対照群に比し、著るしく減少しており臓器あたりのCA量には差異を認めることが出来ない。しかしながら、pair fed 群の脾臓は欠乏群と同様著明な重量の減少を示しており、しかもpair fed 群の臓器あたりのCA量はほとんど変化していないことから、thiamin 欠乏により脾臓においても増加するものと考えられる。他の臓器においては、pair fed 群において、組織重量あたりのCA量は増加を示さないで、thiamine 欠乏による各臓器内のCA含量の増加は、食餌摂取量の減少による臓器の萎縮によるものではないとすることが出来る。Thiamine 欠乏とCAの関係について、Hertting¹⁹⁾、著者の研究以後、thiamine 欠乏の鳩を用いて検討を加え、脳部位ならびに心臓において組織重量あたりのCA量が増加することを追加報告している。

Thiamine 欠乏症状と生体内代謝との関連については、現在まで炭水化物の代謝を中心に数多く研究されて来た。Thiamine 欠乏動物においてはde-carboxylaseの補酵素の欠如のため炭水化物代謝に障害がおこり、血中にpyruvic acid ならびにlactic acidが増加することが認められた。以後thiamine 欠乏とpyruvic acid との関係について二三研究がなされた^{20, 21)} Dejong²²⁾は鳩の多発神経炎とpyruvic acid との関係について実験を行なったが明確な解答を得ないままに終わっている。これらのことからthiamine 欠乏でみられたCAの増加と組織内pyruvic acid の関係を検討すべく欠乏動物の組織内pyruvic acid 含量を測定した。第三節で述べたごとく大脳皮質、小脳、脾臓、肝臓等の臓器において増加がみられたが、欠乏群に4mg/Kgのthiamineを皮下投与するとpyruvic acid 含量は5時間後にはすで

に正常値に回復した。しかしながらCA含量は同処置、同時間では全く回復する傾向が認められなかった。このこととsodium pyruvateを長時間連続投与した際には、逆に組織内CA含量が減少することを考え合わせると、thiamine欠乏でみられるCAの増加は、pyruvic acidの異常蓄積に直接起因するものではないと推測出来る。なおsodium pyruvateの連続投与により組織内のCA含量に減少がみられたが、この減少がストレスに起因するものか、あるいはpyruvic acidの代謝にCAが重要な役割を果し、その結果に起因するものかは、今後より詳細に検討を加える必要がある。

小 括

- 1) Thiamine欠乏ラットの大脳皮質、心房、心室、脾臓等の臓器においては、著明にNA含量が増加し、心房、心室においてはNAの増加とともにAの増加も認められた。
- 2) Thiamine欠乏ラットの組織gあたりの蛋白含量は、肝臓において軽度の増加が、他の組織においては、対照群との間にほとんど変化が認められなかった。
- 3) Thiamine欠乏ラットの大脳皮質、脳幹、ならびに脾臓においてserotonin含量が増加することを認め、小腸では逆に減少することを認めた。
- 4) Thiamine欠乏ラットの大脳皮質、小脳、脾臓、肝臓等の臓器においてpyruvic acidが増加しており、4 mg/Kgのthiamine HCl投与により脾臓を除く各組織において、5時間後には回復した。
- 5) Thiamine欠乏ラットの各臓器に増加したCAは、4 mg/Kgのthiamine HCl投与5時間後においては、高値のままであった。

- 6) 対照動物に sodium pyruvate(3 0 0 mg / kg) を 1 日 2 回、3 0 日間連続腹腔内に投与すると、脳幹、心室、脾臓、副腎等の臓器において C A 含量が減少した。

第 2 章 Thiamine 欠乏動物組織内 Catecholamineの含量の増 加機作

組織内のCAは tyrosine から生合成され、神経細胞内の末端部に存在する顆粒成分の中に貯えられ、一部は細胞画分の可溶性画分中にも貯えられることが知られている。CAの分解には monoamine oxidase (MAO) と catechol-O-methyltransferase (COMT)²³⁻²⁷⁾ ならびに抱合²⁸⁾ が主役を演じている。細胞内CAについては、CAそのものが組織に取り込まれその大部分が細胞内顆粒と結合し、神経刺激により遊離する、いわゆるCAの取り込み(uptake)と遊離(release)のあることも知られている。

前章において、thiamine 欠乏ラットにおいてCAが著明に増加することを述べたが、このCAの増加機作ならびに thiamine 欠乏でのCAの代謝パターンを解明するため以下の実験を行なった。

第 一 節 Thiamine 欠乏ラットの monoamine oxidase 活性

Thiamine 欠乏動物におけるCA増加の原因を知る目的で、まず、細胞内のCAを分解し、その含量を規制している²⁹⁾と考えられているMAO活性の変化について検討を加えた。

実 験 材 料 お よ び 方 法

1. MAO 活性の測定

MAO 活性の測定は、Cotzias³⁰⁾らの方法に準じたTokawa³¹⁾の変法に従い、対照群ならびに欠乏群の摘出臓器を5倍量の0.9% KCl 溶液で

homogenizeし、この組織 homogenate に 0.1 M phosphate buffer (PH 7.4) を用い、基質として 3×10^{-3} M の NA を使用し、37℃ で 1 時間 インキュベートし、その間に発生するアンモニアを測定することにより求めた。

2. 組織内 CA の測定

組織内 CA の測定は前章第三節と同じ方法で行なった。

実 験 成 績

Thiamine 欠乏動物の MAO 活性は、第 8 表に示すように、心房、心室、脾臓等の臓器において有意に低下していることが認められた。

Thiamine 欠乏動物に 4 mg/Kg の thiamine HCl を皮下注射し、5 時間後の酵素活性を測定すると、全組織において、何ら影響なく、正常レベルへの回復は認められなかった。 1 mg/Kg の thiamine HCl を 1 日 2 回、2 日間皮下投与すると thiamine 欠乏で低下した酵素活性は正常値に回復した。(第 8 表)。

Thiamine 欠乏で低下する MAO 活性と pyruvic acid との関係を検討するため前章第 3 節に記したごとく、対照動物に 300 mg/Kg の sodium pyruvate を 1 日 2 回、30 日間連続投与したが、本酵素活性の低下はみられなかった。また組織 homogenate に 1×10^{-4} M の pyruvic acid を in vitro に添加した場合においても何ら変動を認めることが出来なかった。

Thiamine 欠乏で低下した本酵素活性が、thiamine の 2 日間投与により回復することから、本酵素の補酵素として thiamine が関与する可能性も考えられ、thiamine (1×10^{-4} M) ならびに thiamine pyrophosphate (1×10^{-4} M) を、欠乏動物の組織 homogenate に in vitro に加えて測定したが、本酵素活性の回復を認めることが出来なかった。

また、thiamine 欠乏で著明に増加したCAは、4 mg/kg の thiamine HClの皮下投与5時間後では正常への回復を認めなかったが、1 mg/kg の thiamine HClの2日間の皮下投与により、上述のMAO活性の回復と平行してCA含量も正常に回復することを認めた(第9表)。

Table 8. Monoamine oxidase activities ($\mu\text{mol/g h}^{-1}$) by homogenates of the tissues of control and thiamine-deficient rats with noradrenaline as substrate

Tissue	Control (5)	Thiamine deficient (5)	Thiamine deficient †Thiamine (4.0 mg/kg)	Thiamine deficient ‡Thiamine (1.0 mg/kg $\times$ 4)
Cerebral cortex	4.85 $\pm$ 0.61	4.80 $\pm$ 0.57	4.93 $\pm$ 0.81 (5)	4.80 $\pm$ 0.75 (5)
Brain stem	5.09 $\pm$ 0.59	4.98 $\pm$ 0.59	5.50 $\pm$ 0.73 (6)	5.37 $\pm$ 0.52 (6)
Heart atrium	5.32 $\pm$ 0.58	3.69 $\pm$ 0.52*	3.60 $\pm$ 0.55*(6)	4.99 $\pm$ 0.51**(7)
ventricle	4.09 $\pm$ 0.32	2.90 $\pm$ 0.33*	3.14 $\pm$ 0.44*(6)	4.30 $\pm$ 0.54**(6)
Spleen	4.68 $\pm$ 0.59	3.01 $\pm$ 0.51*	3.01 $\pm$ 0.59*(6)	4.66 $\pm$ 0.53**(5)
Liver	8.32 $\pm$ 1.01	8.25 $\pm$ 0.99	8.31 $\pm$ 0.92 (5)	8.72 $\pm$ 1.09 (5)

The values are mean $\pm$ s.e. Figure in brackets refer to number of experiments.

† Thiamine (4.0 mg/kg): In these experiments, 4.0 mg/kg thiamine was injected subcutaneously 5 h before the animals were killed.

‡ Thiamine (1.0 mg/kg $\times$ 4/2 days): 1.0 mg/kg thiamine was injected subcutaneously every 12 h for 2 days and 12 h after the last injection the animals were killed.

* Significant difference from control group ($P < 0.05$).

** Significant difference from thiamine-deficient group ($P < 0.05$).

Table 9. Catecholamine content ($\mu\text{g/g}$) in tissues of thiamine-deficient rats treated with thiamine

Tissue	Control†	Thiamine deficient	Thiamine deficient † thiamine (4.0 mg/kg)	Thiamine deficient ‡ thiamine (1.0 mg/kg)
Cerebral cortex	0.26 $\pm$ 0.04 (4)	0.52 $\pm$ 0.09*(5)	0.43 $\pm$ 0.05*(4)	0.38 $\pm$ 0.06**(5)
Brain stem	0.58 $\pm$ 0.09 (4)	0.63 $\pm$ 0.10 (5)	0.60 $\pm$ 0.07 (5)	0.60 $\pm$ 0.15 (5)
Heart: atrium	1.31 $\pm$ 0.14 (6)	2.60 $\pm$ 0.39*(5)	2.50 $\pm$ 0.31*(5)	2.02 $\pm$ 0.35**(4)
ventricle	0.34 $\pm$ 0.12 (3)	0.94 $\pm$ 0.12*(5)	0.81 $\pm$ 0.10*(5)	0.41 $\pm$ 0.06**(4)
Spleen	0.40 $\pm$ 0.03 (6)	1.95 $\pm$ 0.15*(4)	1.67 $\pm$ 0.12*(6)	0.86 $\pm$ 0.20**(5)
Adrenal gland	1063.0 $\pm$ 107.9 (6)	1107.7 $\pm$ 155.0 (5)	1110.3 $\pm$ 121.9 (6)	1079.7 $\pm$ 74.0 (5)

* Significant difference from control group ($P < 0.05$).

** Significant difference from thiamine-deficient group ($P < 0.05$).

Value: Mean $\pm$ s.e., Each group: 3-4 rats, Number of groups are in parentheses.

†† See footnotes to Table 1.

‡ The data are those previously reported (Iwata & others, 1968).

第二節 Thiamine 欠乏ラットの Catechol-O-methyltransferase 活性

Thiamine 欠乏ラットの MAO 活性に低下が認められたことを前節で述べたが、細胞内から循環中に放出された CA の代謝分解に²⁴⁾関与すると考えられている肝 COMT 活性についても検討を加えた。

実験材料および方法

Thiamine 欠乏群ならびに対照群の肝臓を 8 倍量の 0.9 % KCl で homogenate とし、 $12.000\text{ g} \times 30\text{ min.}$ 、遠沈後その上清を酵素溶液として用いた。反応液の組成としては、 $70\text{ }\mu\text{g}$ の NA、 5.2 mole の MgCl_2 $210\text{ m}\mu\text{mole}$ の S-adenosyl methionine、 $70\text{ }\mu\text{mole}$ の phosphate buffer (pH 7.8)、 0.25 ml の酵素溶液を用い、終末容量を 1 ml とし、 37°C で 1 時間 incubate し、生成した normetanephrine を定量し COMT 活性を測定した。なお、生成した normetanephrine の分離精製は、谷口ら³²⁾の方法に従って、Dowex-50 のカラムに吸着させ、 0.01 N のアンモニアで溶出し精製した。この溶出液を KClO_4 で脱 O-methyl 化して NA とし、以下は前章第三節に記したごとく trihydroxyindole 法により NA 量を測定し、normetanephrine 量に換算することによって本酵素活性を測定した。

実験成績

Thiamine 欠乏ラットの肝臓の COMT 活性は $13.98\text{ }\mu\text{g/g}$ 新鮮組織/hr. で、対照群の COMT 活性 $14.23\text{ }\mu\text{g/g}$ 新鮮組織/hr. と比較して

有意な変動を認めなかった。

第三節 Thiamine 欠乏ラット血液中 C A 含量

一般に交感神経の刺激によって神経末端からは主としてNAが、内臓神経の刺激によって副腎からAおよびNAが血液中に遊離することが知られている。³³⁾ Thiamine 欠乏状態での循環中へのCAの遊離の様子を検討するため血液中のCA量を測定し、併せてCAの増加機作をうかがおうとした。

実験材料および方法

Thiamine 欠乏ラット、対照ラットならびに pair fedラットを断頭し、血液を0.4 NのKClO₄を入れた容器にとり、アイス・ストッカー内に一夜放置し、後これを室温で融解させる。融解後この容器をはげしく振盪し血液成分の除蛋白を完全にし、CAを抽出する。抽出したCAを前章と同じCroutら¹⁴⁾の方法に従いアルミナのカラムを通過させ精製する。精製したCAの溶出液をさらにDowex-1のカラムで受け、さらに精製し、この液をsampleとして、trihydroxyindole 法により血液中のCAを測定した。

Dowex-1の精製：市販のDowex 1 (x8, type 1, Cl型) をカラムにつめ5倍量の2 NのNaOH, 10倍量の水、5倍量の2 Nの酢酸、10倍量の水といった順序でカラムに通し、Dowex-1を精製しかつ酢酸型にした。

実験成績

欠乏ラットの血中CA量は、第10表に示すごとく、対照群の半量にまで減少していた。また、pair fed群においても軽度の減少が認められた。なお、

血液中のCAは三群とも主としてNAであった。

Table 10.

Blood catecholamine content of thiamine deficient rats

	Catecholamine content ($\mu\text{g/ml}$)	<i>P</i> ^c
Control ^a	0.030 ± 0.002 (5)	< 0.01
Thiamine deficient	0.015 ± 0.001 (4)	
Pair-fed ^b	0.025 ± 0.003 (4)	< 0.05

^a Fed on the thiamine deficient basal diet supplemented with 3 mg thiamine hydrochloride per kg. ^b Given daily an amount of control diet of the same weight as that eaten by the deficient group. ^c Significant *P* values in relation to the thiamine deficient group. Four rats were used in each experiment and the values represent the mean $\pm$ S.E. of the number of experiments shown in parenthesis.

第四節 Thiamine 欠乏ラット組織内 Catecholamine の合成能

CAの増加機作をさらに詳細に検討するため、CA合成能を、MAO inhibitor であるCatron (JB-516)を投与し、この間にみられる組織内CAの蓄積量より測定することにした。

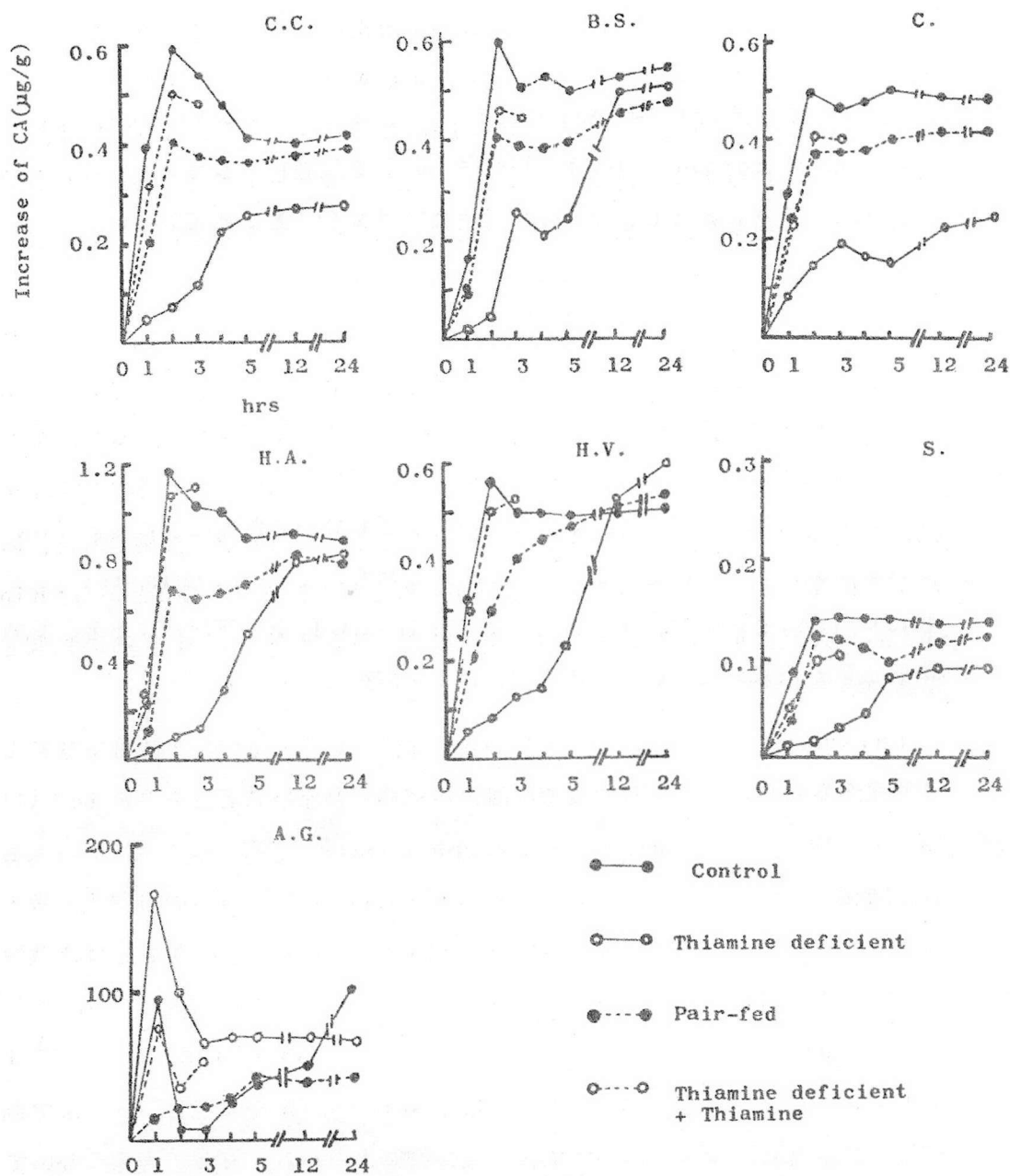
実験材料および方法

欠乏群、対照群ならびに pair fed 群に、 10 mg/Kg の Catron (β -phenyl-isopropylhydrazine HCl; JB-516) を腹腔内に投与し、1, 2, 3, 4, 5, 12, 24時間後に断頭し、第1章で述べた方法でCA量を測定した。

実験成績

第2図に示すごとく、Catron投与後のCA含量の増加は、thiamine欠乏ラットの大脳皮質、脳幹、小脳、心房、心室等の臓器で、対照群ならびに pair fed 群に比べて著明に低く、thiamine欠乏動物のこれら臓器においては、CAの合成能が著明に低下していることが認められた。一方 thiamine欠乏動物に Catron と同時に、 4 mg/Kg の thiamineHCl を皮下注射すると、CAの合成能が全組織においてほぼ正常値にまで回復した。

Fig. 2. Effect of thiamine on catecholamine increase in tissues of thiamine deficient rat



C.C.; Cerebral cortex, B.S.; Brain stem, C.; Cerebellum, H.A.; Heart atrium, H.V.; Heart ventricle, S.; Spleen, A.G.; Adrenal gland

第 2 章 の 総 括 と 考 察

Thiamine 欠乏動物の CA の増加がみられた組織において MAO 活性の抑制が認められ、また thiamine 投与により CA の回復と時間的に平行して MAO 活性も回復することから、thiamine 欠乏での組織内 CA の増加は、ある程度、MAO 活性の抑制に起因していることが推測出来る。このことは、MAO 活性は、中枢神経系ならびに末梢組織で CA の遊離を調節し、その含量を規制するという報告²⁹⁾と一致し興味ある事実である。

一方、欠乏群の肝臓の COMT 活性は、対照群と比較して、変化が認められないにもかかわらず血中 CA 量が半量にまで減少していることから、CA の循環中への遊離が thiamine 欠乏により著るしく阻害されていることがうかがえる。Thiamine 欠乏動物では、組織内の CA 含量が増加するにもかかわらず CA の合成能が低下しており、さらに CA の遊離ならびに分解が抑制された、いわゆる CA の turnover rate の低下が認められた。これらのことから thiamine 欠乏でみられる CA の増加は、組織内から循環中への遊離の抑制と MAO 活性の低下に起因するといえる。

Thiamine 欠乏での MAO 活性の低下は、thiamine の 2 日間投与により回復がみられるが、5 時間後では回復が認められないことならびに *in vitro* に thiamine, thiamine pyrophosphate を添加した際にも酵素活性の回復がなかったことを考慮すると、thiamine を MAO の補酵素と考えるよりはむしろ、本酵素活性の低下は、thiamine 欠乏という 2 次的な代謝障害によると考えた方が妥当であろう。

Thiamine 欠乏ラットの MAO 活性については、1961 年、Gall³⁴⁾はミトコンドリア画分を用いて、基質として serotonin を使用し、検圧法で測定し、全脳ならびに小腸においては軽度の抑制がみられ、肝臓、脾臓においては変化が認められないことを報告している。しかしながら、本酵素の基質が多様性であることが知られており、測定方法ならびに用いる基質がことなれば活

性に差異が生ずることは当然考えられる。

血液中のCAについては、含量が少なく、精製の際に、アルミナからCAがdopa, 3,4-dioxymandelic acid, 3,4-dioxyphenyl acetic acidとともに溶出され、これらが蛍光測定値を妨害することが考えられるのでアルミナカラムの他に更にDowex-1を用いて精製した。更に血液成分がCAと結合し、また血小板もCAと結合することが報告されている³⁵⁾ので、血球を完全に破壊し、除蛋白を完全に行ない得るように血液を0.4 Nの $KClO_4$ で凍結し、融解後はげしく振盪してCAの抽出に細心の注意を払った。なお小動物の血中CAの定量に関する報告はこれが最初である。

MAO阻害剤を用いて、CAの蓄積量より、合成能を検討した実験は、すでにUdenfriendら³⁶⁾やSpectorら³⁷⁾によってなされ、1968年には、Kulkarniら³⁸⁾が同じ方法で幼若ラットの中樞神経系のCAの合成能が成熟ラットに比べて低いことを報告している。本実験においては、thiamine 欠乏ラットの脾臓ならびに副腎を除く各組織においてCAの合成能が低下していることを認めた。Thiamine 欠乏では、Catronの細胞膜透過性、吸収、ならびにその効果発現に相違のあることも考えられることから、kynuramineを基質に用いて本酵素活性を測定したが、Catron投与15分後にはすでに欠乏群、対照群ともにほぼ完全に阻害(90%~100%)されることを確認している。³⁹⁾

小 括

- 1) Thiamine 欠乏ラットのMAO活性は、心房、心室、脾臓等の臓器において低下していることが認められた。
- 2) Thiamine 欠乏ラットに1 mg/Kg のthiamine HClを1日2回、2日間投与すると、低下した酵素活性は正常値に回復した。
- 3) 300 mg/Kg のsodium pyruvateを対照ラットに、1日2回、30日間連続腹腔内に投与したが、MAO活性には変動がなかった。

- 4) 対照ラットの組織 homogenate に、 1×10^{-4} M の pyruvic acid を添加した場合も変動がなかった。
- 5) Thiamine 欠乏ラットの組織 homogenate に、 1×10^{-4} M の thiamine HCl ならびに 1×10^{-4} M の thiamine pyrophosphate HCl を添加したが、MAO 活性の回復を認めなかった。
- 6) Thiamine 欠乏ラットの肝臓の COMT 活性は、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。
- 7) Thiamine 欠乏ラット血液中 CA 量は 15 ng/ml で、対照群の血中 CA 量 (30 ng/ml) の半量に減少していた。
- 8) Thiamine 欠乏ラットの大脳皮質、脳幹、小脳、心房、心室等の臓器内の CA の合成能は著るしく低下していることが認められた。
- 9) Thiamine 欠乏ラットに、 4 mg/Kg の thiamine を皮下注射すると、1 時間後には CA の合成能が著明に改善された。

第 3 章 Thiamine 欠乏動物組織内 Catecholamine の turnover rate の低下の生理学的意義ならびに 増加した Catecholamine の存在 部位とその性質

CA は哺乳動物の中樞神経系に広く分布し、ある種の neuron の神経伝達物質として機能を営んでいる可能性があり、末梢神経系ならびに副腎においては、第 1 章で記述したごとく交感神経系の刺激伝達物質および分泌ホルモンとして、内臓神経の刺激、あるいは、ある種の刺激により遊離されることが知られている。

一方、生体内に投与した CA は直接血管に作用し、末梢血管を収縮させ、また心臓に作用しては、その収縮力ならびに心拍数を増加させ血圧を上昇させる。更にまた、交感神経支配の平滑筋においては、ある種の刺激により神経末端から CA が遊離され、受容体 (α -receptor, β -receptor 等) に作用して収縮または弛緩させることが明確にされている。⁴⁰⁻⁴³⁾ またその間にみられる生化学的な変化は、細胞膜での K イオンあるいは Ca イオンの動態に影響を与え、⁴⁴⁻⁴⁷⁾ 更に糖代謝ならびに脂質代謝にも大きな影響を与え⁴⁸⁻⁴⁹⁾ 生体の機能を調節している。

第 2 章において、thiamine 欠乏では、組織内の CA の turnover が低下していることを述べたが、このような状態にある時、生理的には如何なる症状が現われるか、更には thiamine 欠乏で増加した CA の存在部位とその性質について検討を加えた。

第 1 節 Thiamine 欠乏ラットの血圧

第 1 章ならびに第 2 章で、thiamine 欠乏動物では組織内の CA の turn-

over が遅く、また血中の CA 量が低下していることを述べた。このような時、血圧がどのような状態にあるかを検討した。

実験材料および方法

血圧の測定は、欠乏群、対照群、pair fed 群に、urethane 0.6 g/Kg を腹腔内投与し、 0.6 g/Kg を皮下投与して麻酔した。カニューレを右大頸脈に挿入し、水銀マンオメータを介して煤紙上に描記した。また血液中の CA の定量は前章で記した方法で行なった。

実験成績

Thiamine 欠乏動物の平均血圧値は、第 11 表に示すごとく、 95 mm Hg で、対照群の 120 mm Hg に比較して著明に低下していることが認められた。Pair fed 群の血圧は、対照群と同程度であった。Thiamine 欠乏動物に 4 mg/Kg の thiamine HCl を皮下注射し、投与後、1, 3, 5 時間後に血圧を測定すると、1 時間後においてすでに回復がみられ、3 ~ 5 時間後には、正常値にまで回復することが認められた。同処置をした動物を断頭し、血液中の CA 量を測定すると、血圧の変動と密接に関連し、血圧の低い thiamine 欠乏動物では血中 CA 含量も低下しており、また 4 mg/Kg の thiamine 投与による血圧の回復と平行して、血中 CA 量も回復することが認められた。

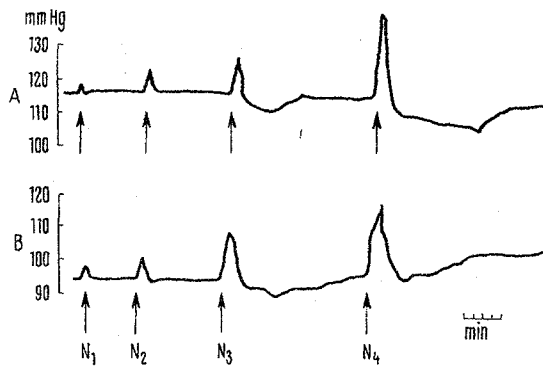
欠乏動物、対照動物の大腿静脈より、tyramine ならびに NA を投与し、これら薬物に対する感受性について検討を加えたが、第 3 図に示すごとく、対照群との間に差異を認めることが出来なかった。また欠乏動物への tyramine の反復投与により、血圧の基線が対照群の値にまで上昇することが認められた。Thiamine 欠乏動物に 1 mg/Kg の tyramine を腹腔内に投与し、2 時間後に血中の CA 量を測定すると、 35 ng/ml と対照群の値にまで上昇した。

Table 11

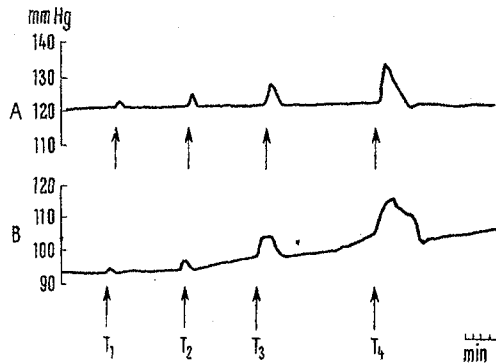
Relationship between catecholamine content in blood and blood pressure

	Catecholamine content ($\mu\text{g/ml}$)	Blood pressure (mmHg)
Control	0.030	120
Thiamine deficient (heart rate 330)	0.015	95
Thiamine deficient ($\nearrow$ 410)	0.020	112
Thiamine deficient ($\nearrow$ 330) + Thiamine (4.0mg/kg.s.c.)	0.020	105
Pair-fed	0.025	109

Fig. 3.



Blood pressure of carotid artery of thiamine deficient rat and effect of DL-noradrenaline on it. N_1, N_2, N_3, N_4 (DL-noradrenaline hydrochloride 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g/kg}$, respectively). (A) Control rat, (B) thiamine deficient rat. Anesthesia was done with 1.2 g/kg i.p. of urethane. Drugs were given into femoral vein.



Blood pressure of carotid artery of thiamine deficient rat and effect of tyramine on it. T_1, T_2, T_3, T_4 (tyramine monohydrochloride 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/kg, respectively). Other conditions are the same as in Figure 1.

第二節 Thiamine 欠乏動物の心拍数

Thiamine 欠乏動物が心拍数の減少（徐脈）を示すことは、すでに1929年Carterら⁵⁰⁾が報告している。その後、この徐脈の成因を追求すべく数多くの研究がなされた。Peterら^{51, 52)}はTCA-cycleの抑制剤であるfluoro-citrate をラットの蜘蛛膜下腔に注射することにより徐脈を惹起せしめることを認め、TCA-cycleの代謝回転と関係のあることを報告している。著者もこの徐脈の発現を解明すべく2, 3の検討を加えた。

実験材料および方法

動物を飼育時と同じ、恒温（ $20 \pm 4^{\circ}\text{C}$ ）、恒湿（ $50 \pm 10\%$ ）の部屋で、無麻酔、無拘束で心拍数を心電計を用いて測定した。

CAの合成能は、第2章、第四節で述べた方法で測定した。

実験成績

心拍数が対照群の70%以下に減少したthiamine欠乏動物に、 4 mg/Kg のthiamine HClを皮下注射すると、注射後15分から遅くとも3時間以内に対照群あるいは正常群（市販固型飼料で飼育した動物）のレベルにまで回復することを認めた（第12表）。

Table 12 Thiamine 欠乏ダイコクネズミ拍動数の変化

Normal	Basal diet thiamine*	Thiamine deficient		Restricted
		Before thiamine	After thiamine** 3 hrs	
451 ± 11 (10)	496 ± 11 (10)	321 ± 4 (10)	482 ± 11 (10)	419 ± 33 (10)

Mean $\pm$ S.E.

*: Thiamine 欠乏合成飼料 1kg に thiamine HCl 3mg を添加

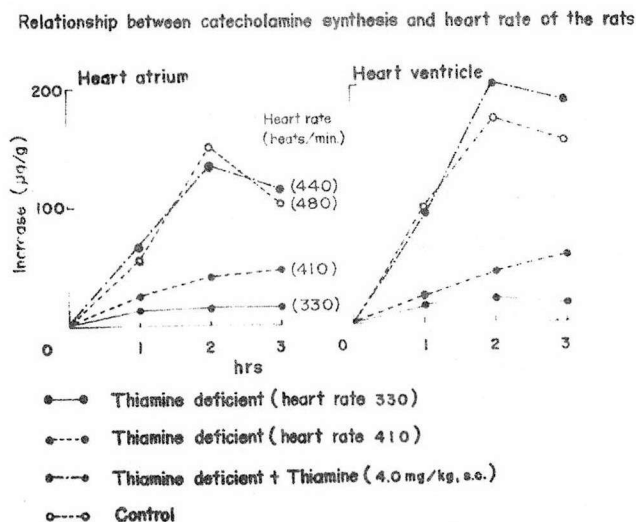
**： Thiamine HCl 1mg/kg 皮下注射。（ ）内は動物数

Restricted: Pair feeding

第2章で thiamine 欠乏動物の CA の turnover が遅く、また、thiamine 投与によりこの turnover が急速に回復することを述べた。そこでこの心拍数の変動と CA の turnover との関係について検討を加えた。

心拍数 310 beats/min. および 410 beats/min. の thiamine 欠乏動物の心房、心室の CA の合成能は、第4図に示すごとく著明に低下しており、心拍数が 310 の心房、心室の CA 合成能は、心拍数 410 の軽度の thiamine 欠乏動物のそれに比し、より著明に低下していた。また、thiamine 欠乏動物に、4 mg/kg の thiamine HCl を皮下注射し、著明に心拍数が増加し、対照群の値にまで回復した（心拍数が 330 から 440 ならびに 480 に回復）動物の心房、心室の CA 合成能も著明に上昇し、CA の合成能と心拍数とは密接な関係にあることが認められた（第4図）。

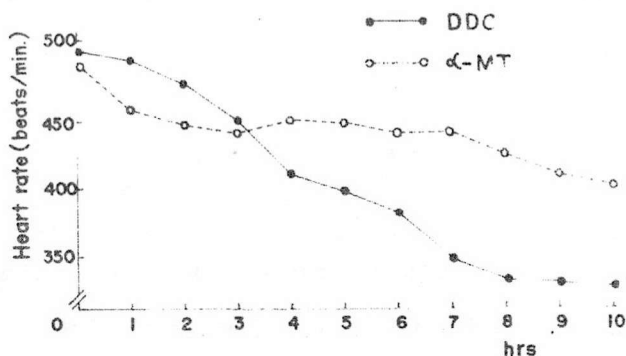
Fig. 4.



このように thiamine 欠乏動物の心拍数と CA の turnover とは密接な関係にあることから、対照動物においても CA の turnover を低下させると心拍数も減少するのではないかと考え、対照動物に CA の合成酵素である tyrosine hydroxylase の阻害剤である α -MT (α -methyl-p-tyrosine) を 300 mg/kg を腹腔内に、また dopamine- β -oxidase 阻害剤である DDC (sodium diethyl dithiocarbamate) 200 mg/kg を2時間毎に4回投与し、心拍数を測定した。第5図に示すごとく、これら CA の合成阻害剤を投与することにより、心拍数が著明に減少することが認められた。

Fig. 5.

Effects of DDC and α -MT on heart-rates of the rats



DDC: Sodium diethyldithiocarbamate (800 mg/kg.i.p.)

α -MT: α -Methyl-p-tyrosine (300 mg/kg.i.p.)

第三節 Reserpine, tyramine, dl-amphet-amine 投与による Catecholamine の変動と behavior

前節において CA の turnover と心拍数とは密接な関係にあることを述べたが、thiamine 欠乏動物においては、CA の turnover の減少と組織内 CA の増加がみられる。この増加した CA を作用機作の異なる CA releaser により人為的に CA を放出させ、CA の turnover を変化させた場合の心拍数の変動ならびに behavior について検討を加えた。

実験材料および方法

心拍数の測定は前節に記した方法で、また組織内 CA は前述の trihydroxy-indole 法により測定した。また、reserpine は 20 % の ascorbic acid に溶解し、dl-amphetamine sulfate, tyramine HCl は 0.9 % の生理食塩水に溶解して用いた。なお、reserpine は皮下に tyramine, amphetamine は腹腔内に投与した。

実験成績

対照ラットならびに pair fed ラットに 1 mg/Kg の reserpine を皮下投与すると、2 時間後には、自発運動の減退、鎮静に引き続き体温の降下、呼吸抑制、外来の刺激に対する無関心、眼瞼下垂、昏睡、下痢等が著明に現われた。しかしながら thiamine 欠乏動物に同量の reserpine を投与した場合、5 時間後においても自発運動の軽度な抑制が観察される程度で、外来の刺激に対しても反応を示し、上述の諸種反応はほとんど観察されなかった。対照群ならびに pair fed 群に 50 mg/Kg の amphetamine を投与すると、30 分後に

は運動量の増加、興奮、眼瞼突出が観察された。一方、thiamine 欠乏動物に同量の amphetamine を投与した場合には、これら諸種症状が対照群に比し、より著明に現われた。

対照群、pair fed 群に 10 mg/Kg の tyramine を投与した場合、両群とも外観上の behavior の変動はほとんど観察されなかった。一方、thiamine 欠乏動物に同量の tyramine を投与した場合は、amphetamine 投与によりみられるような興奮状態は全く観察されなかったが、投与 2 時間後には、運動量の増加、食欲増加がみられ、振顫、旋回、痙攣等も一部改善された。

上述と同量の reserpine ならびに tyramine を投与した場合の心拍数を第 6 図に示す。

対照群ならびに pair fed 群に reserpine を投与すると、その心拍数は著明に減少するが、thiamine 欠乏群では、ほとんど認められなかった。一方、tyramine を投与した場合には、thiamine 欠乏では、reserpine の場合とは逆に、心拍数の著明な増加がみられ、投与 2 時間後においては、 400 beats/min. にまで増加することが認められた。しかしながら、対照群、pair fed 群においては、この心拍数の増加作用はほとんど認めることが出来なかった。

Fig. 6.

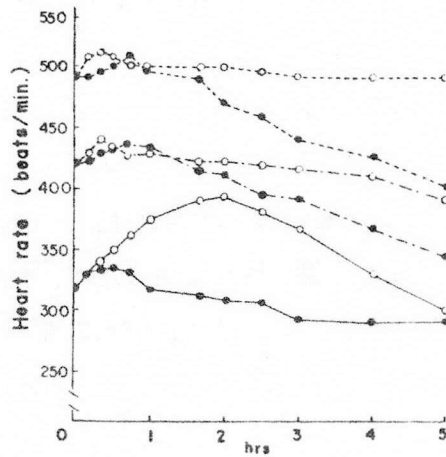


Fig. 1. Effects of reserpine and tyramine on the heart rate of thiamine-deficient rats. Ordinate: Heart rate (beats/min). Abscissa: Time after injection of drugs. (---) control. (—) thiamine-deficient. (---) pair-fed. (—○—) tyramine (10 mg/kg). (—●—) reserpine (1 mg/kg). Each value represents the mean of 6 experiments.

次に、これら CA releaser を用いた場合の CA 含量の変動について検討を加えた。

対照群ならびに thiamine 欠乏群に 1 mg/Kg の reserpine を投与し、5, 12, 24 時間後に各組織内の CA 含量を測定した。Reserpine 投与後の CA 含量を第 7 図に示す。薬物投与 5 時間後においては、CA の遊離量は欠乏群と対照群の間に差異はほとんど認められなかった。すなわち、thiamine 欠乏群では、薬物投与後の組織内残存 CA 含量が高く、12 時間後においても脳幹、心房においては残存 CA 含量が多かった。また、投与 12 時間後においては、大脳皮質、小脳、心室、脾臓等の臓器において、thiamine 欠乏動物と対照動物とは同じ含量を示した。副腎においては、投与 12 時間後では、欠乏動物の方がより著明に遊離された。

Fig. 7.

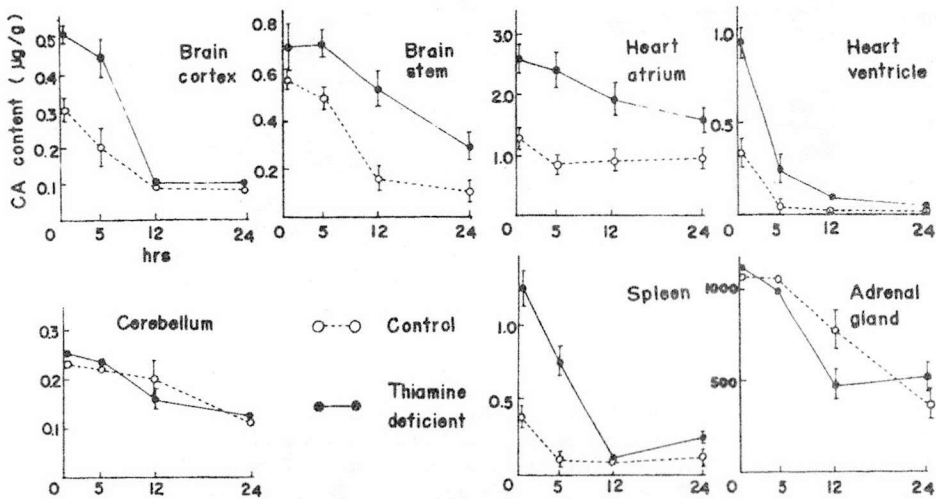


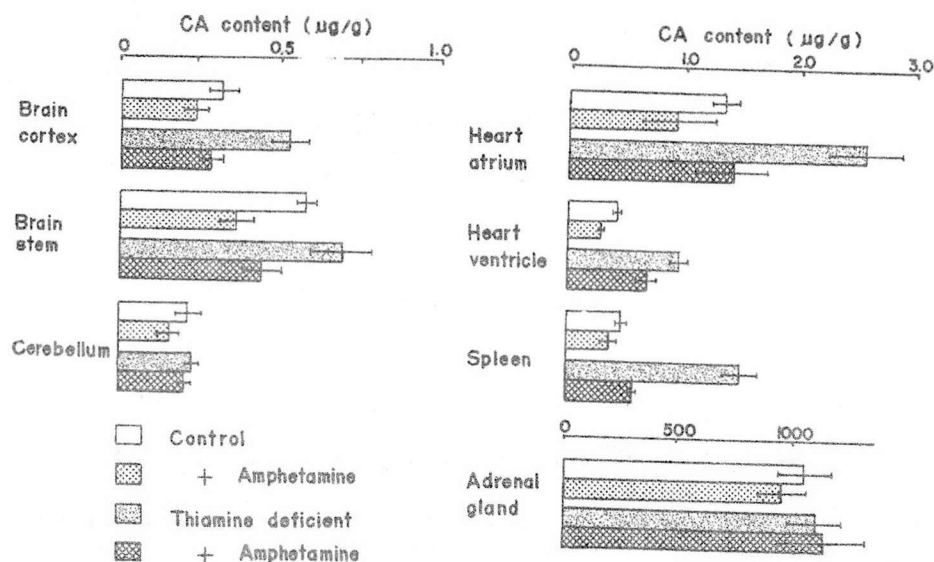
Fig. 2. Effects of reserpine on the catecholamine levels in various tissues of thiamine-deficient rats. Catecholamine content 5, 12 and 24 hours after subcutaneous injection of reserpine 1 mg/kg. Ordinate: Catecholamine content ($\mu\text{g/g}$). Abscissa: Time after injection of reserpine. The values are the means $\pm$ standard errors.

対照動物ならびに欠乏動物に上述と同量の amphetamine あるいは tyramine を投与し、5 時間後の組織内 CA 含量を第 8 図、および第 9 図に示した。

対照動物に amphetamine を投与して 5 時間後に組織内 CA 含量を測定すると、大脳皮質、脳幹ならびに心房、心室において軽度に CA が減少した。一方、thiamine 欠乏動物に同量の amphetamine を投与した場合は、thiamine 欠乏で著明に増加していた大脳皮質、心房、心室、脾臓等の CA 含量が減少し、対照群の値、あるいは、対照群に amphetamine を投与した場合と同量にまで減少した。

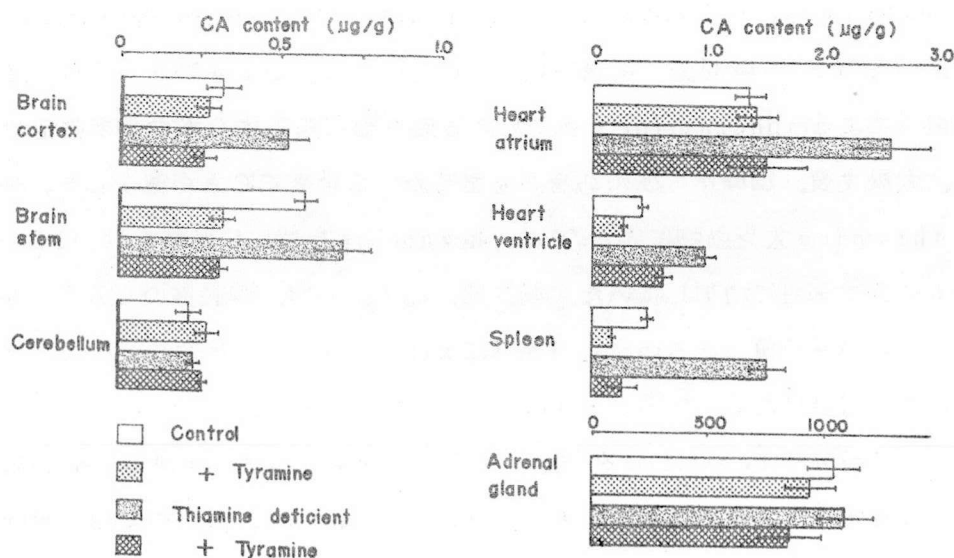
また、対照群に tyramine を投与した場合、脳幹、心室、脾臓等の臓器においては CA 含量の軽度の減少がみられた。Thiamine 欠乏動物に tyramine を投与した場合には、amphetamine 投与の場合と全く同様、thiamine 欠乏で増加を示した組織内 CA 含量は、対照群の値あるいは対照群に tyramine を処置した場合と同量になるのが認められた。

Fig. 8.



Effects of amphetamine on catecholamine content of various tissues in thiamine-deficient rats. Catecholamine content 5 hr after intraperitoneal injection of dl-amphetamine 50 mg/kg. CA: Catecholamine. The values are the means $\pm$ standard errors.

Fig. 9.



Effects of tyramine on the catecholamine content of various tissues in thiamine-deficient rats. Catecholamine content 5 hr after intraperitoneal injection of tyramine 10 mg/kg. CA: Catecholamine. The values are the means $\pm$ standard errors.

第四節 Thiamine 欠乏ラットの insulin shock 抵抗性

生体に酸素欠乏、急激な興奮、低血糖、寒冷、出血等の諸種ストレスが加わると、副腎髄質からCAの遊離が上昇することはよく知られている。一方、insulinが副腎からCAを遊離させることも周知の事実である。このinsulinの副腎からのCAの遊離の機構の詳細は不明の点が多く、また、神経系におけるCAがinsulinによってどのような影響を受けるかについての知見はまだこれをみない。とくに、insulinの糖質代謝における役割を考慮に入ると、中枢神経系のCAがこのホルモンによりどのような影響を受けるかは、その部位におけるCAの生理的意義の解明にとって重要な問題である。前章において、著者はreserpine, amphetamine, tyramine等の薬物によって起る組織内CAの変動と行動変化の関連性をthiamine 欠乏動物と対照動物について検討した。そこで、次に組織内のCAの遊離とturnoverの低下しているthiamine 欠乏ラットを用いて、insulinを投与した場合の生体反応とCAの変動について実験を行なった。この場合、insulinの投与量はとくに低血糖によるshockを発現させる大量を選びshock時の中枢神経系におけるCAが果たす役割についての情報を得んとした。

実験材料および方法

欠乏群、対照群ならびにpair fed群の三群に100 i.u./Kgのinsulinを腹腔内に投与した。Insulin投与後はケージから餌料を取り除き、水のみを自由に与えた。Insulin投与後は、飼育時と同じ恒温、恒湿の部屋で実験した。また組織内CA含量は、trihydroxyindole法で、また血糖は動物を断頭し、全血を用いて、Morris⁵¹⁾のanthrone法により測定した。

実 験 成 績

対照動物ならびに pair fed 動物に 100 i.u./Kg の insulin を腹腔内に投与すると、1.5 時間後において自発運動の抑制に続き、振顫、間代性痙攣等の症状が観察され、2.5 時間後には虚脱状態になり、昏睡期を経て、3.2 時間後には全動物が死亡した。一方、thiamine 欠乏動物に同量の insulin を投与した場合には、自発運動の軽度な抑制が観察される程度で、痙攣や虚脱状態は全く観察されず全例に死亡が認められなかった。Thiamine 欠乏動物に、insulin 投与の 5 時間前に 4 mg/Kg の thiamine HCl を皮下に前処置すると、対照動物ならびに pair fed 動物にみられた痙攣、虚脱、昏睡等の諸種症状が発現し、7 時間後には 5 例中 4 例が死亡した（第 12 表）。

Table 12 *Effect of thiamine-deficiency on the lethal effect of insulin.* Insulin (100 i.u./kg) was injected intraperitoneally. Thiamine hydrochloride (4 mg/kg) was injected subcutaneously 5 h before insulin.

	No. of animals	Mortality (%)
Control	28	100
Thiamine-deficient	26	0
Pair-fed	8	100
Thiamine-deficient + thiamine	5	80

Insulin による shock は、臨床上、患者にブドウ糖液を静脈内注射すると正常に回復することから、insulin の血糖低下作用に起因すると考えられている。そこで、insulin shock に対する抵抗性を示した thiamine 欠乏ラットにおいて、同量の insulin が血糖値にどのような影響を与えるかについて検討した。

対照動物に insulin を投与すると、1 時間後に、初期値の 50 %、2 時間後には 70 % の減少がみられ、死亡寸前には、血糖は全く検出されなくなった。一方、thiamine 欠乏動物においては、投与 2 時間以内では、対照群に比し、

より急速に減少するが、5時間後においてもなお7~8 mg/dlの血糖値を示した。pair fed群においては、投与2時間では、thiamine 欠乏動物でみられたごとく、急速に血糖が降下するが、約2.8時間後には血糖は検出されなくなった(第10図)。

Fig. 10.

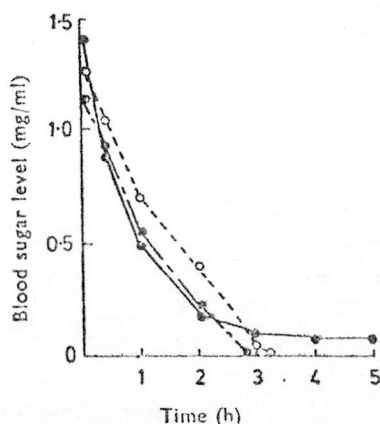
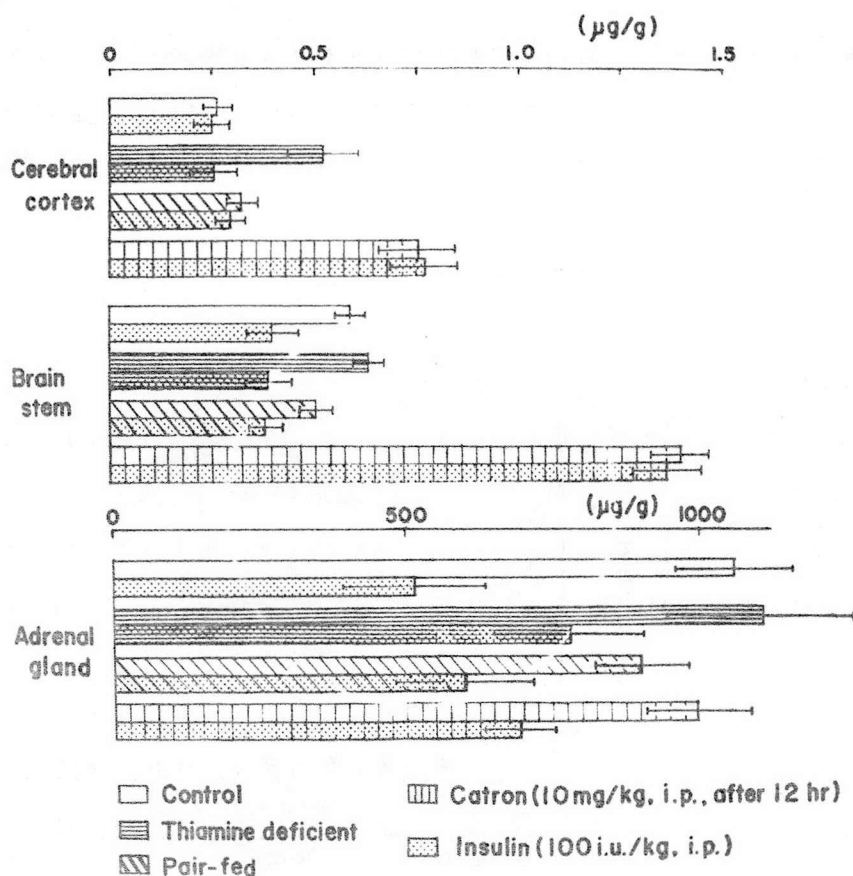


FIG. 1. Effect of insulin (100 i.u./kg, i.p.) on the blood sugar level of rats. Each point represents the mean of values of 3 to 5 animals. ●—● Thiamine deficient; ○--○ control; ●—● pair fed.

次に欠乏群、対照群ならびに pair fedに同量の insulinを投与し、3時間後に、大脳皮質、脳幹ならびに副腎の CA 含量を測定した。対照群ならびに pair fed群に insulinを投与した場合、脳幹、副腎において CAの減少が認められ、一方、thiamine 欠乏動物に投与した場合は、脳幹、副腎のほか、大脳皮質においても CAの減少がみられた(第11図)。

Fig. 11.



第 3 章 の 総 括 と 考 察

Thiamine 欠乏動物ならびに欠乏動物に thiamine を投与した動物でみられたごとく (第 11 表)、血液中の CA 量と血圧とは密接な関係にあり、thiamine 欠乏でみられる血圧の低下は血中 CA 量の減少に起因するものと推定出来る。

Thiamine 欠乏での心拍数の減少、血圧の低下、更に諸種多発性神経炎症状の発現ならびに thiamine 投与によるこれら症状の改善は、神経の刺激伝達物質である CA の turnover の変動と密接な関係にあることが明らかになった。即ち、これら諸種症状の発現時には、CA の turnover も低下しており、

また、thiamine 投与による CA の turnover の急速な回復に伴いこれら症状が著明に改善される。このことから著者の認めた thiamine 欠乏動物での血圧の低下は、組織内 CA の turnover の低下の結果として、血中 CA 量も低下しこれが上述したごとく血圧の低下を惹起するものと推測される。

以上の実験結果から、thiamine 欠乏でみられる諸種症状の発現と回復は、組織内 CA の turnover の変動と一致することが明らかになった。このことより、thiamine 欠乏では、交感神経系あるいはある種の neuron での神経刺激伝達物質としての機能維持に障害をきたし、更には、CA の cyclic 3',5'-AMP を介する作用減弱の結果、糖代謝、脂質代謝等の代謝調節の乱れならびにイオン透過性等の変化が生じ、複雑且つ重症の神経症状がひき起こされるものと考えられる。しかしながら、thiamine 欠乏症状の全容を CA の turnover の低下に起因するものと断定することはなお早計であり、thiamine の補酵素としての作用、cholinergic 面での機能ならびに中枢神経系でのより詳細な機能維持における役割等についても十分考慮する必要がある、更に病理組織学的な所見との関係についても詳細に検討しなければならず、今後の課題となる。

CA の releaser である reserpine は神経細胞の比較的内部にある顆粒内の CA を放出し、⁵²⁻⁵⁸⁾ ミトコンドリアの膜に存在する MAO を活性化し、⁵⁵⁻⁵⁸⁾ 生理的不活性な脱アミノ化された CA を循環中に放出すること⁵⁹⁾ が知られている。一方、tyramine, dl-amphetamine の場合は、交感神経に機械的な刺激を与えた場合と同様に、神経末端 (synaptic terminal) の比較的小さな顆粒内の CA と置き替り、生理的に活性な CA を循環中に放出することが知られている。⁶⁰⁻⁶³⁾

対照群に、1 mg/kg の reserpine を投与した場合、1 時間後には、自発運動の減少、眼瞼下垂等の鎮静状態が観察されるが、thiamine 欠乏動物に同量の reserpine を投与した場合には、その抑制作用はほとんど観察されず、12 時間後においても対照群と比較すると、その鎮静状態は極めて軽度であった。

この場合、reserpine 処置によって組織内より減少する CA 量は、thiamine 欠乏群、対照群でほぼ等しく、残存 CA 量についてみると、対照群では欠乏群に比し、著しく減少している。このことが対照動物で鎮静状態ならびに心拍数の著明な減少を来す原因であると推測される。

Thiamine 欠乏群では、MAO 活性が抑制されており、更に組織内 CA の初期値が高いことから reserpine 投与後にも、残存 CA 量が多く、この残存 CA が生理的に活性な型（未変化の CA）で循環中に放出されて、receptor と結合するため、鎮静状態や心拍数の低下がほとんど起らないものと推測出来る。このような結果は、動物をあらかじめ MAO 阻害剤で前処置し、reserpine による組織内の CA の分解ならびに減少を抑制すると鎮静状態が観察されないという報告⁶⁴⁻⁶⁶)と一致している。

一方、対照群に tyramine を投与した際には、心拍数の増加はほとんど認められなかったが、thiamine 欠乏群では、心拍数の著明な増加を示し、これと平行して、thiamine 欠乏で増加した組織内 CA が正常値にまで減少した。このことから、thiamine 欠乏で異常に蓄積した組織内の CA が tyramine により生理的に活性な型で神経細胞外に放出され、これが receptor と結合し、上述の心拍数の増加を示したものと考えられる。また、thiamine 欠乏動物に amphetamine を投与した場合、対照群と比較して、興奮がより著明に観察されたことは、tyramine の場合と同様、thiamine 欠乏動物では中枢神経内から放出される CA 量が対照群に比し、より多いためと推測される。

また、reserpine 投与 5 時間— 12 時間後に放出される CA 量は、対照群と thiamine 欠乏群の間で、著明な差異はなかった。一方、tyramine や amphetamine 投与により、thiamine 欠乏で増加した全組織の CA が正常値に減少し、著明な生理的 response を示した。これらのことから、thiamine 欠乏で増加した CA の存在部位は、神経末端のいわゆる synaptic terminal の CA 含有顆粒であると推定出来る。

Thiamine 欠乏でみられる組織内 CA 量の増加ならびに組織内 CA の turn-

overの減少と insulin shockに対する抵抗性との直接関係は、なお明確にすることが出来なかったが、thiamine 欠乏動物では副腎と大脳皮質のCAが著明に減少し、一方、対照群、pair fed群では大脳皮質での減少はみられず、副腎と脳幹のみの遊離しか認められないことから、thiamine 欠乏では、大脳皮質から遊離されたCAが insulin shockに対して抵抗性を示すのかも知れない。Thiamine 欠乏動物の insulin shockに対する抵抗性を説明するもうひとつの可能性としては、欠乏動物の組織内CAの turnoverの問題である。この問題に関しては、第5章で述べるが、thiamine 欠乏動物に1 i.u./Kgの insulinを投与すると、対照群に同処置をしたものに比べて、全組織のCAの turnoverが著明に増加する事実である。Insulinの投与量は異なるが、この組織内CAの turnoverの上昇が、insulin shockに対して抵抗性を示すことが考えられる。更にもうひとつの可能性としては、副腎機能の亢進が考えられる。

Thiamine 欠乏動物では、cortisoneの感受性に相異があるとの報告⁶⁷⁾があることから、glucocorticoidが insulin shockの抵抗性に関与していることも考えられる。更に、insulinの作用に拮抗するものとして、glucagon, ACTH, thyroxine 等も考慮する必要があるが、用いた insulinの量が100 i.u./Kgの大量であることから、これらホルモンの関与は比較的可能性が少ないように思える。また、対照群では、insulin 投与により血糖値が初期値の30%以下になると、痙攣、虚脱状態を示すが、欠乏群では、10%以下に減少しても自発運動の抑制がみられるのみであった。Insulin shockに対する抵抗性の起因については、血糖値以外に、他の糖質、アミノ酸、ケトン体、更には、insulinの代謝分解、中枢神経系でのイオンの動態についても十分考慮しなければならないものとする。

小 括

- 1) Thiamine 欠乏動物の血圧は、 95 mmHg で対照群の 120 mmHg に比較して著明に低下していることが認められた。
- 2) Thiamine 欠乏動物に 4 mg/kg の thiamine を皮下注射すると、1 時間後で回復が認められた。
- 3) Thiamine 欠乏動物の血中 CA 量は 15 ng/ml で対照群の値 (30 ng/ml) に比べ、著明に低下していた。
- 4) Thiamine 欠乏動物に 4 mg/kg の thiamine を投与することにより、1 時間で回復した。
- 5) Thiamine 欠乏動物の tyramine ならびに NA の血圧に対する感受性は、対照群との間に差異は認められなかった。
- 6) Thiamine 欠乏動物に tyramine 10 mg/kg を腹腔内に投与すると、血液中の CA 量の増加とともに血圧も正常に回復した。
- 7) 心拍数の対照群の 70 % 以下に低下した thiamine 欠乏動物に 4 mg/kg の thiamine を皮下注射すると、注射後 15 分から遅くとも 3 時間以内には正常値に回復した。
- 8) 心拍数 310 beats/min の thiamine 欠乏群の心房、心室の CA 合成能は、心拍数 410 beats/min の thiamine 欠乏群の心房、心室の CA 合成能に比し、より著明に低下していた。
- 9) Thiamine 欠乏動物に 4 mg/kg の thiamine を皮下注射することにより、心拍数の増加とともに、同組織での CA の合成能も増加した。
- 10) 対照動物に、 300 mg/kg の $\alpha\text{-MT}$ 、ならびに 200 mg/kg の DDC を 2 時間毎に 4 回、皮下投与することにより、心拍数が著明に減少した。
- 11) Thiamine 欠乏動物に 1 mg/kg の reserpine を投与した場合、5 時間後においても自発運動の軽度な抑制が観察される程度で、対照動物に同処置をした場合にみられる眼瞼下垂、昏睡、下痢等は全くみられなかった。

- 12) Thiamine 欠乏動物に 50 mg/Kg の dl-amphetamine を腹腔内に投与すると、対照群に同処置をした場合に比較し、運動量の増加、興奮状態、眼瞼突出はより著明であった。
- 13) Thiamine 欠乏動物に reserpine 1 mg/Kg を投与した場合には、対照群にみられる様な心拍数の低下はほとんどみられなかった。
- 14) Tyramine を投与した場合、対照群においては心拍数の増加は全く認められなかったが、thiamine 欠乏群においては著明に増加した。
- 15) Thiamine 欠乏動物ならびに対照動物に、 1 mg/Kg の reserpine を投与した場合、両群とも、組織内より遊離される CA 量には、5 時間～12 時間後においては、ほとんど差はなかった。
- 16) Thiamine 欠乏動物に 10 mg/Kg の tyramine あるいは 50 mg/Kg の amphetamine を投与すると、5 時間後には組織内の CA 含量は正常値に回復した。
- 17) Thiamine 欠乏動物に 100 i.u./Kg の大量の insulin を腹腔内に投与した場合、対照群でみられる虚脱状態や昏睡は全く観察されず、insulin shock に対して極めて強い抵抗性を示した。
- 18) Thiamine 欠乏動物に、 100 i.u./Kg の insulin を投与する 5 時間前に、 4 mg/Kg の thiamine を処置すると、shock 症状が発現し、7 時間後には 5 例中 4 例が死亡した。
- 19) 対照群と thiamine 欠乏群では、血糖値にはほとんど差を認めなかった。
- 20) 対照動物に 100 i.u./Kg の insulin を投与した場合、その血糖値は 1 時間後に初期値の 50 % に低下し、死亡寸前には検出不可能となった。
- 21) Thiamine 欠乏動物に 100 i.u./Kg の insulin を投与すると、2 時間までは対照群に比較し、より急速に血糖値が減少するが、5 時間後においてもなお $7 \sim 8 \text{ mg/dl}$ の血糖値を示した。
- 22) 対照群に 100 i.u./Kg の insulin を投与すると、脳幹、副腎の CA 含量が減少し、thiamine 欠乏動物の場合は、脳幹、副腎の他、大脳皮質においても CA 量が減少した。

第4章 遊離型 thiamine からエステル型 thiamine への促進因子について

Thiamine 欠乏動物の組織内 thiamine 含量については数多くの報告があり、森川^{68, 69)}は遊離型 thiamine 量のエステル型 thiamine 量に対する割合（遊離型／エステル型）は、対照群に比較して増加することを報告している。著者も thiamine 欠乏ラットの組織内 thiamine 含量を遊離型とエステル型に分けて測定し、組織内 CA 含量ならびに CA の turnover との関係について検討を加え、更に遊離型 thiamine のエステル型 thiamine に対する割合が増加する因子について検討を加えた。

第1節 Thiamine 欠乏ラット組織内 thiamine 含量

実験材料および方法

対照動物ならびに thiamine 欠乏動物を断頭後、各臓器を 0.9% 生理食塩水で血液を洗い落とし、0.1 N H_2SO_4 （副腎は 3 ml、他の臓器は 5 ml）で homogenize し、この homogenate を 85℃～90℃で 30 分間水浴中で加熱し、組織内の thiamine を抽出する。抽出液を冷却後、3 M の CH_3COONa で PH 4.75 に調節し、常法により調整したタカジアスターゼ液を加え、55℃の水浴中で加熱した後、9,000 g で 15 分間遠沈し、その上清液を藤原ら⁷⁰⁾の BrCN 法により組織内の thiamine 含量を測定した。なお、遊離型の thiamine 量はタカジアスターゼ酵素液を反応させない場合の測定値で示し、エステル型の thiamine は酵素液を作用させたものについて測定した。

実 験 成 績

対照群の組織内 thiamine 含量を、第 13 表および第 12 図に、また thiamine 欠乏群の組織内 thiamine 含量を、第 14 表および第 12 図に示す。

欠乏動物の組織内 thiamine 含量は遊離型、エステル型ともに全組織において著明に減少し、特に肝臓においては、対照群の 9 % にまで減少した。また心房においては遊離型の thiamine は著明に減少するが、エステル型の thiamine の減少は比較的少なく、対照群の 88 % に減少するにすぎず、遊離型のエステル型に対する割合は対照群に比べて逆に高くなっている。心房以外の全臓器においては、この割合が著明に上昇し、2 倍—12 倍にまで上昇していた。Thiamine 欠乏動物に 1 mg/Kg の thiamine ならびにその誘導体である thiamine propyl disulfide (TPD) 1.06 mg/Kg を 1 日 2 回、2 日間皮下投与すると、総 thiamine 含量は、正常値に回復した。しかしながら、遊離型の thiamine 含量が多く、遊離型とエステル型の比は対照群と比較して高かった。

Table 13.

Thiamine content ($\mu\text{g/g}$) in tissues of control rat

	Free form thiamine	Ester form thiamine	Free + Ester form thiamine	Free / Ester
Cerebral cortex	0.57 ± 0.04	2.81 ± 0.31	3.38 ± 0.31	0.20
Brain stem	0.53 ± 0.04	3.26 ± 0.30	3.79 ± 0.30	0.16
Cerebellum	0.45 ± 0.04	4.42 ± 0.39	4.87 ± 0.38	0.10
Heart atrium	1.66 ± 0.25	1.10 ± 0.02	2.76 ± 0.23	1.51
ventricle	0.46 ± 0.08	5.22 ± 0.74	5.68 ± 0.78	0.09
Spleen	0.62 ± 0.08	1.54 ± 0.03	2.15 ± 0.27	0.40
Adrenal gland	1.83 ± 0.09	2.71 ± 0.04	4.54 ± 0.05	0.67
Liver	1.73 ± 0.02	8.80 ± 0.09	10.53 ± 0.10	0.20

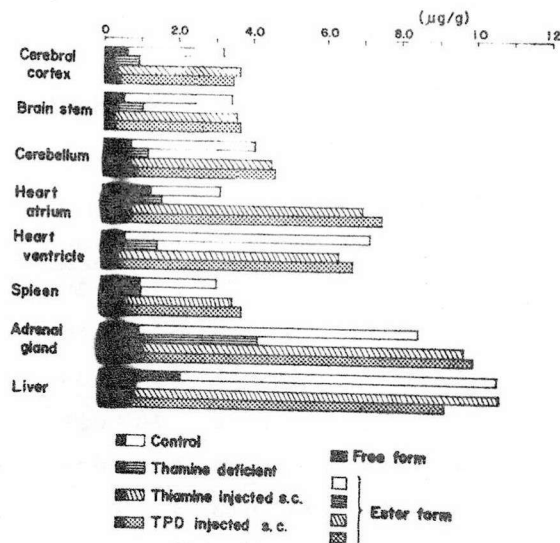
Table 14.

Thiamine content($\mu\text{g/g}$) in tissues of thiamine deficient rat

	Free form Thiamine	Ester form Thiamine	Free + Ester Thiamine	Free / Ester
Cerebral cortex	0.35 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.06	0.97 $\pm$ 0.09	0.57
Brain stem	0.25 $\pm$ 0.03	0.97 $\pm$ 0.07	1.22 $\pm$ 0.01	0.26
Cerebellum	0.61 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.08	1.24 $\pm$ 0.09	0.97
Heart atrium	0.38 $\pm$ 0.04	1.27 $\pm$ 0.09	1.65 $\pm$ 0.11	0.30
ventricle	0.34 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.08	0.50
Spleen	0.36 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.07	0.82
Adrenal gland	0.51 $\pm$ 0.07	2.20 $\pm$ 0.09	2.71 $\pm$ 0.12	0.23
Liver	0.66 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.08	2.41

Fig. 12.

Thiamine content in tissues of control and thiamine deficient rats



第二節 Insulin の作用

前節で記したごとく、thiamine 欠乏動物では遊離型 thiamine のエステル型に対する割合が著明に増加することを認めたが、alloxan 糖尿病ラットにおいてもこの割合が増加することが知られている。⁷¹⁾ 更に、alloxan 糖尿動物においては、食慾不振、体重減少、基礎代謝の低下、筋緊張の減弱、立毛、軽度の徐脈、更には、運動量の減少ならびに不調和、痙攣、振顫等の症状をともなった thiamine 欠乏動物と類似の多発性神経症状が観察されることはすでに知られている。⁷²⁻⁷⁵⁾ このようなことから、thiamine 欠乏動物においても、alloxan 糖尿動物の場合と同様に膵 β -細胞よりの insulin の遊離の障害、または内因性 insulin に対する感受性の低下があるものと推測される。

そこで、thiamine 欠乏動物に insulin を投与し、この際みられる behavior、心拍数の変動ならびに組織内の遊離型、エステル型 thiamine の変動について検討を加えた。

実験材料および方法

Thiamine 欠乏動物ならびに対照動物に、 1 i.u./kg の insulin を腹腔内に投与し、水、餌料を自由に与えて、behavior、心拍数を検討した。

また、組織内の遊離型ならびにエステル型の thiamine 含量は前節と同じ方法で測定した。

実験成績

Thiamine 欠乏動物に 1 i.u./kg の insulin を腹腔内に投与すると、3—12 時間後には、食慾の増加、運動量の増加が観察され、更に痙攣、振顫、

旋回等もある程度改善された。また同量の insulin 投与後の心拍数は3時間後において有意な増加を示し、5—24時間後では、対照群の心拍数近くまで回復することが認められた。一方、対照群に同量の insulin を投与した場合は、投与1—2時間後に、一過性の運動量の減少が認められたが、30分以内に正常に復した。その他の behavior の変動は観察されなかった。対照動物に insulin を投与して運動量の減少が観察される時期には、一時的に心拍数の低下も認められたが、運動量の増加とともに心拍数も正常値に回復した。

次に、thiamine 欠乏動物ならびに対照動物に同量の insulin を投与し、5時間後、12時間後の遊離型、エステル型の thiamine 含量を測定した。第15表に示すごとく、thiamine 欠乏動物に insulin を投与した場合、5時間後では、総 thiamine 含量は、大腦皮質、脳幹、小脳、心室、肝臓においては、未処置欠乏群との間に差は認められず、心房、脾臓、副腎においては軽度の増加が認められた。また遊離型 thiamine のエステル型に対する割合は心室を除く全ての臓器において著明に増加し、対照群の値近くに戻り回復した。

Insulin 投与12時間後においては、総 thiamine 含量は、心房、副腎において軽度の増加がみられるが、他の臓器では変動は認められず、またこの割合も著明に減少し、対照群の値と同等あるいは、それ以下となった。

Table 15.

Thiamine content ($\mu\text{g/g}$) in tissues of thiamine deficient rat treated with insulin (1 i.u/kg, i.p.)

	After 5 h		After 12 h	
	Free + Ester thiamine	Free/Ester	Free + Ester thiamine	Free/Ester
Cerebral cortex	1.100	0.224	1.379	0.059
Brain stem	1.517	0.195	1.320	0.125
Cerebellum	1.667	0.178	1.429	0.068
Heart atrium	2.325	0.215	2.766	0.085
ventricle	1.169	0.459	0.909	0.350
Spleen	2.001	0.297	0.622	0.513
Adrenal gland	3.999	0.129	2.950	0.263
Liver	0.805	0.938	0.702	0.217

一方、対照群に同量の insulin を投与した場合、5 時間後において、全組織の総 thiamine 含量には、未処置対照群との間にほとんど変動は認められないが、遊離型 thiamine のエステル型 thiamine に対する割合が、大脳皮質、脳幹、心房、脾臓、肝臓で軽度に減少することが認められた（第16表）。

Table 16.

Effect of insulin on thiamine phosphotransferase in tissues of thiamine deficient and control rats

(Free form/Ester form thiamine)

	Thiamine deficient	Thiamine deficient + insulin	Control	Control + Insulin
Cerebral cortex	0.57	0.22	0.20	0.13
Brain stem	0.26	0.19	0.16	0.08
Cerebellum	0.97	0.18	0.10	0.18
Heart atrium	0.30	0.21	1.51	0.72
ventricle	0.50	0.45	0.09	0.08
Spleen	0.82	0.30	0.40	0.30
Adrenal gland	0.23	0.13	0.67	0.60
Liver	2.41	0.94	0.20	0.11

Insulin (i.u./kg. i.p.), after 5 hours

第三節 Tyramine , dl-amphetamine の作用

前節で述べたごとく、thiamine 欠乏動物でみられる組織内の遊離型 thiamine のエステル型 thiamine に対する比の増加が、insulin 投与により著るしく減少し正常値に回復することが認められた。一方、thiamine 欠乏動物では組織内の CA の turnover の減少と、組織内 CA の異常蓄積も考慮に入れると、この増加した組織内の CA を第3章、第三節において用いたような CA releaser を投与することにより、組織内の CA の turnover を変動

させた場合には、この比がいかなる変動を示すかについて検討を加えた。更にまた、この変動と組織内CAの変動との間の相互関係についても検討を加えた。

実験材料および方法

Thiamine 欠乏動物ならびに対照動物の組織内の遊離型 thiamine、エステル型 thiamine の定量は前節で述べた方法で行なった。

なお、tyramine, dl-amphetamine, reserpine 投与後は、餌料および水を自由に与えた。

実験成績

Thiamine 欠乏動物に 1mg/Kg の reserpine を皮下に投与し、5 時間後に、thiamine 含量を測定すると、全組織において遊離型の thiamine ならびにエステル型の thiamine 含量ともに、ほとんど変動は認められなかったが、tyramine を 10mg/Kg 腹腔内に投与すると、5 時間後に、大脳皮質、脳幹、小脳、心房、心室、脾臓、副腎、肝臓等の全組織において遊離型の thiamine 含量が著明に減少することが認められた。 10mg/Kg の dl-amphetamine を腹腔内に投与した場合も、tyramine でみられたと同様、大脳皮質、脳幹、小脳、心室、副腎、肝臓において、遊離型の thiamine が著明に減少した(第 17 表)。なお、エステル型の thiamine 含量は、全組織においてほとんど変動が認められなかった。

Table 17.

Effects of reserpine, tyramine, and dl-amphetamine on free form thiamine content($\mu\text{g/g}$) and catecholamine level($\mu\text{g/g}$) in tissues of thiamine deficient rat

	Thiamine def.	+Reserpine	+Amphetamine	+Tyramine
Cerebral cortex	0.35 (0.52)	0.22 (0.13)	0.05 (0.21)	0.01 (0.23)
Brain stem	0.25 (0.63)	0.26 (0.34)	0.11 (0.38)	0.09 (0.26)
Cerebellum	0.61 (0.24)	0.56 (0.12)	0.13 (0.22)	0.30 (0.25)
Heart atrium	0.38 (2.60)	0.62 (1.78)	0.31 (1.37)	0.09 (1.31)
Heart ventricle	0.34 (0.94)	0.36 (0.03)	0.07 (0.70)	0.01 (0.53)
Spleen	0.36 (1.95)	0.40 (0.37)	0.30 (0.48)	0.01 (0.20)
Adrenal gland	0.51 (1107.7)	0.49 (778.5)	0.004 (1123.7)	0.30 (898.2)
Liver	0.66	0.60	0.15	0.10

Reserpine (3mg/kg, i.p.), after 5 hours
 Tyramine (10mg/kg, i.p.), "
 dl-Amphetamine (10mg/kg, i.p.), "

Thiamine content (CA level)

一方、対照動物に同量の reserpine を投与した場合も、thiamine 欠乏動物の場合と同様、全組織において、5 時間後に、遊離型、エステル型の thiamine とともに変動を認めなかった。

対照動物に MAO 阻害剤である Catron 10mg/Kg を腹腔内に投与し、同時に同量の reserpine を皮下に投与した場合には、5 時間後に、大脳皮質、脳幹、小脳、心房、副腎において、遊離型の thiamine 含量に減少がみられた。なお、Catron のみの投与 5 時間後では、全組織において遊離型、エステル型 thiamine 両含量ともに変動は認めなかった。一方、 10mg/Kg の tyramine を投与した場合は、脳幹、脾臓において遊離型の thiamine が軽度に減少し、dl-amphetamine 10mg/Kg の場合は、大脳皮質、脳幹、小脳、心房、心室、脾臓等の臓器において、遊離型 thiamine が減少した (第 18 表)。なお、対照動物の場合も、これら CA の releaser を与えた場合、エステル型の thiamine 含量にはほとんど変動がなかった。

Table 18.

Effects of reserpine, tyramine and dl-amphetamine on free form thiamine content ($\mu\text{g/g}$) and catecholamine level ($\mu\text{g/g}$) in tissues of control rat

	Control	+Reserpine	+Amphetamine	+Tyramine
Cerebral cortex	0.57 (0.26)	0.52 (0.06)	0.20 (0.18)	0.57 (0.25)
Brain stem	0.53 (0.58)	0.50 (0.21)	0.21 (0.24)	0.42 (0.26)
Cerebellum	0.45 (0.22)	0.47 (0.20)	0.18 (0.22)	0.42 (0.25)
Heart atrium	1.66 (1.31)	1.58 (0.78)	0.26 (0.91)	1.50 (1.33)
Heart ventricle	0.46 (0.34)	0.42 (0.03)	0.16 (0.20)	0.38 (0.21)
Spleen	0.62 (0.40)	0.60 (0.04)	0.41 (0.36)	0.22 (0.17)
Adrenal gland	1.83 (1063.0)	1.65 (823.7)	0.001 (901.7)	1.64 (983.8)
Liver	1.73	2.01	1.54	1.83

この様に、tyramine ならびに dl-amphetamine は、組織内の CA の turnover を変化させることにより、組織内の遊離型の thiamine を減少させる。この関係を第 17 表および第 18 表に示した。表の数値は、薬物未処置または薬物処置 5 時間後の組織内遊離型 thiamine 含量を、括弧内の数値は組織内の CA 含量を示している。このことから、組織内の遊離型 thiamine 量の減少と組織内 CA 量の減少とは極めて密接な関係にあることが明らかである。

第 4 章 の 総 括 と 考 察

Thiamine 欠乏動物の組織内の遊離型の thiamine、エステル型 thiamine はともに全組織において著明に減少するが、遊離型のエステル型に対する割合は逆に増加することが認められた。Thiamine 欠乏でみられるこの割合の増加は、thiamine 投与により減少し、正常に回復するが、insulin

投与によっても正常値への回復がみられた。一方、thiamine 欠乏でみられた心拍数の低下も insulin 投与により著明に増加し、正常値にまで回復する。Thiamine 欠乏では、前述の CA の turnover の低下とともに、膵 β -細胞よりの insulin 遊離の障害、あるいはまた、内因性 insulin の欠乏状態が考えられる。即ち thiamine 欠乏動物では、内因性 insulin の欠乏状態の結果 thiaminokinase (thiamine phosphotransferase) 活性の低下が生じ、遊離型 thiamine のエステル型に対する割合が増加し、insulin を投与することにより本酵素活性が上昇して、この割合が減少することが考えられる。

Thiamine 欠乏動物に tyramine ならびに amphetamine を投与すると、対照動物に同処置をした場合と比較して遊離型の thiamine 含量が全組織において、より著明に減少し、遊離型/エステル型の比が減少した。これは、これら CA の releaser を投与することにより、thiamine 欠乏で異常に蓄積した組織内の CA、即ち神経末端の CA が神経末端の顆粒より多量に放出され、receptor と結合して、細胞膜の adenylyl cyclase 活性を上昇させて、cyclic 3',5'-AMP 量を増加させ、この cyclic 3',5'-AMP が thiamine 欠乏で低下していた膵 β -細胞よりの insulin の遊離を促進し、thiaminokinase 活性を上昇させた結果と推測出来る。(なお、この推論に関しては、thiamine 欠乏動物で低下した組織内の CA の turnover を tyramine 等を用いて回復させることにより、膵 β -細胞よりの insulin の遊離が促進されること、ならびに、対照動物においても組織内 CA の turnover を低下させることにより、膵 β -細胞よりの遊離に阻害がかかることを認め、著者ら⁷⁶⁾は本論文以外の実験で明確にしている。)

一方、thiamine 欠乏動物に reserpine を投与した場合に、thiamine 含量に変動が認められないことは、前章で述べたごとく、reserpine により、神経細胞内で不活化(脱アミノ化)された CA が放出される結果、adenylyl cyclase 活性の増加が惹起されず、従って、膵 β -細胞よりの insulin の遊離が促進されない為と考えられる。また、対照動物に reserpine と Catron

を同時投与すると、遊離型の thiamine が軽度ではあるが全組織において減少したことは、MAOの阻害の結果、reserpineにより放出されるCAが一部活性な型で神経細胞外に放出され、receptor と結合する結果かも知れない。

Tyramine ならびに amphetamine 投与により組織内の遊離型の thiamine が減少するもうひとつの可能性として、組織内CAの減少量と組織内遊離型 thiamine の減少量とが密接な関係にあることから（第17, 18表）、神経細胞内の末端顆粒よりのCAの遊離にともない、遊離型の thiamine も放出されることが推測される。このことは、thiamine 欠乏動物では、組織内遊離型 thiamine の減少の結果、神経末端よりのCAの遊離に障害が生じ、組織内にCAが異常に蓄積し、更に組織内CAの turnoverが減少することが考えられる。即ち thiamine 欠乏動物では、CAの turnover の低下の結果、膵β細胞よりの insulin の遊離阻害が生じ、これが thiaminokinase 活性の低下をきたし、組織内での、遊離型 thiamine のエステル型に対する割合が増加するものといえる。また、CAの組織内よりの消失とともに遊離型の thiamine も減少することは、上述の insulin 遊離の促進により thiaminokinase が活性化されることと、CAの遊離にともない遊離型の thiamine も細胞外に出るという2つの機構が同時に生体内でおこっているためと考える。

小 括

- 1) Thiamine 欠乏動物の組織内 thiamine 含量は、遊離型、エステル型ともに全組織において著明に減少していることが認められた。
- 2) Thiamine 欠乏動物の心房以外の全組織においては、遊離型 thiamine のエステル型 thiamine に対する割合は、対照群と比較して著明に増加していた。
- 3) Thiamine 欠乏動物に $1 \text{ }^{\mu}\text{g}/\text{Kg}$ の thiamine を投与することにより、総 thiamine 含量ならびに上述の割合が正常に回復した。
- 4) Thiamine 欠乏動物に、 $1 \text{ i.u.}/\text{Kg}$ の insulin を腹腔内に投与することにより、thiamine 欠乏でみられる痙攣、振顫、旋回等の神経症状がある程度改善された。この場合心拍数は、3 時間後に増加を示し、5～24 時間後には対照群の心拍数にまで回復した。
- 5) Thiamine 欠乏動物に同量の insulin を投与すると、遊離型 thiamine のエステル型 thiamine に対する割合は、全組織において正常値に回復した。
- 6) 対照動物に同量の insulin を処置した場合にも上述の割合が、大脳皮質、脳幹、心房、脾臓、肝臓等の臓器で軽度に減少した。
- 7) Thiamine 欠乏に $1 \text{ }^{\mu}\text{g}/\text{Kg}$ の reserpine を投与した場合には、全組織において、総 thiamine 含量ならびに上述の割合にはほとんど変化はみられなかった。
- 8) Thiamine 欠乏動物に、 $10 \text{ }^{\mu}\text{g}/\text{Kg}$ の tyramine を腹腔内に投与すると、5 時間後に、大脳皮質、脳幹、小脳、心房、心室、脾臓、副腎、肝臓等の全臓器において遊離型 thiamine が著明に減少することが認められた。
- 9) $10 \text{ }^{\mu}\text{g}/\text{Kg}$ の amphetamine を thiamine 欠乏動物に腹腔内投与した場合も、大脳皮質、脳幹、小脳、心室、副腎、肝臓において遊離型 thiamine が著明に減少した。

- 10) 対照動物に $1 \text{ }^{\mu}\text{g}/\text{Kg}$ の reserpine を投与した場合、5 時間後においては、全組織において、総 thiamine 含量ならびに上述の割合に、ほとんど変動はみられなかった。
- 11) 対照動物に、同量の reserpine と $10 \text{ }^{\mu}\text{g}/\text{Kg}$ の Catron を腹腔内に同時投与した場合には、5 時間後で、大脳皮質、脳幹、小脳、心房、副腎等の臓器において、遊離型の thiamine の減少がみられた。
- 12) 対照動物に $10 \text{ }^{\mu}\text{g}/\text{Kg}$ の Catron を投与した場合には、総 thiamine 含量、遊離型の thiamine 含量ともに変動は認めなかった。
- 13) 対照動物に tyramine $10 \text{ }^{\mu}\text{g}/\text{Kg}$ を腹腔内に投与すると、脳幹、脾臓において、遊離型の thiamine が減少した。

第 5 章 Insulin の組織的 Catecholamine の turnover rate 促進作用

Thiamine 欠乏動物に insulin を投与することにより、低下していた心拍数が著明に増加し、正常値に回復するとともに、欠乏状態でみられる多発性神経症状がある程度改善された。それと同時に遊離型 thiamine からエステル型 thiamine への移行促進作用 (thiamine phosphotransferase の活性化) がみられた。これらの原因として、前章で、thiamine 欠乏で組織内 CA の turnover の低下により、膵 β -細胞よりの insulin 遊離が抑制され、その結果、thiamine 欠乏動物では、循環中に insulin が欠乏していることが考えられると述べた。

本章では、このように、循環中の insulin が欠乏状態にある時、逆に、insulin を投与した際、組織内 CA の turnover に対して如何なる影響を与えるかについて検討を加えた。

なお、組織内の CA の合成能は、第 2 章、第四節で述べた方法で、Catron を投与し、この間に蓄積される組織内 CA 量を測定することにより得た。

実 験 材 料 お よ び 方 法

Insulin の組織内 CA の turnover に対する影響を検討する方法は次の通りである。

- A : 未処置動物の組織内 CA 含量を測定する (未処置動物の組織内 CA 含量)
- B : 動物に 10 mg/Kg の Catron を腹腔内に投与し、1 時間後の組織内 CA 含量を測定する (未処置動物の組織内 CA 含量 + 組織内 CA の 1 時間の増加分) 。
- C : 動物に 1 i. u. / Kg の insulin を腹腔内に投与して、5 時間後の組織内 CA 含量を測定する (insulin 投与 5 時間後の組織内 CA 含量) 。

D : 動物に 1 i.u./Kg の insulin を投与し、5 時間後に、 10 mg/Kg の Catron を腹腔内に追加投与し、1 時間後の組織内 CA 含量を測定する (insulin 投与 5 時間後の組織内 CA 含量 + insulin 投与による組織内 CA の 1 時間の増加分)

対照動物ならびに thiamine 欠乏動物の insulin による組織内 CA の合成能に対する影響は insulin 末処置動物の組織内 CA の 1 時間の増加分と、insulin 投与後の組織内 CA の 1 時間の増加分とを比較することにより検討することが出来る。即ち、insulin による組織内 CA の合成能増加分 = $(D - C) - (B - A)$ によって表わされる。

なお組織内の CA 含量の測定は、第 1 章、第三節で述べた方法で、また血液中の CA 量の測定は第 2 章で述べた方法で行なった。

実 験 成 績

対照動物ならびに thiamine 欠乏動物の 1 i.u./Kg の insulin による、組織内 CA の合成能に対する影響を第 13 図に示す。

対照動物に 10 mg/Kg の Catron を投与した 1 時間後では、第 2 章で述べたごとく、脾臓、副腎を除く全ての組織で CA 量が著明に増加することが認められるが、thiamine 欠乏動物に同処置をした場合には、全組織においてほとんど、その増加は認められなかった。

一方、血液中の CA 量は Catron 処置により対照群の場合、減少を示すが、欠乏群の場合には変化は全くみられなかった。

対照群に同量の insulin を投与すると、5 時間後においては、脳幹、小脳、副腎の CA 量が減少し、心房、心室では著明に増加することが認められた。なお、血液中の CA 量は図には示していないが、同量の insulin 投与 1 時間後においては、 45 ng/ml と著明に増加していたが、5 時間後には、正常値の範囲に復帰した。

一方、thiamine 欠乏動物に、同量の insulin を処置すると、5 時間後において、大脳皮質、脳幹、小脳、脾臓、副腎の CA 量が著明に減少し、心房、心室においては、変動は全くみられなかった。また、thiamine 欠乏動物の血中 CA 量は、insulin 投与 5 時間後では全く変動がみられなかった。しかしながら、insulin 投与 1 時間後では、対照群の場合と同様、 22 ng/ml に増加することが認められた。

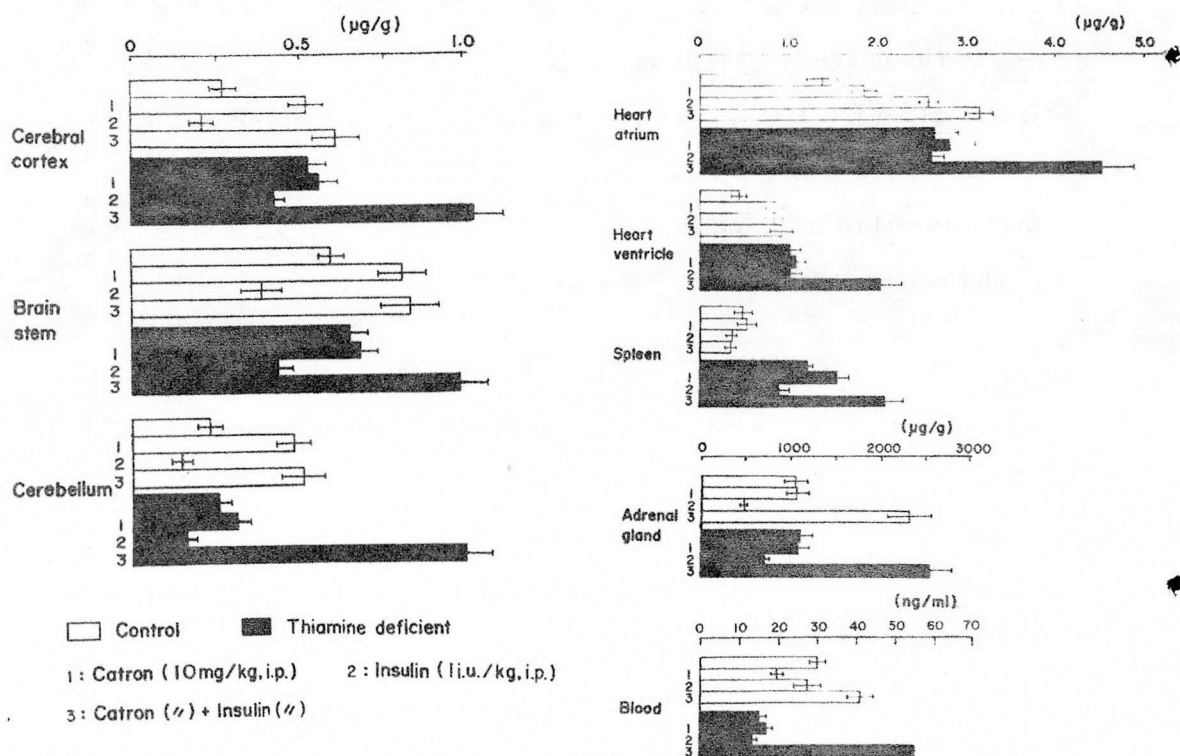
対照動物の insulin による各組織内の CA の合成能に対する影響を検討すると、脳幹、小脳、特に副腎において著明に合成能が増加することが認められた。

一方、thiamine 欠乏動物では、大脳皮質、脳幹、小脳、心房、心室、脾臓ならびに特に副腎において、insulin により、CA の合成能が著明に増加することが認められ、血液中 CA 量も著明に増加した。

なお、insulin による組織内 CA の増加は全組織において、対照群に比較して、thiamine 欠乏群でより著明であった。

Fig. 13.

Effect of insulin on catecholamine synthesis of rats



第 5 章 の 総 括 と 考 察

対照動物に 1 i.u./kg の insulin を腹腔内に投与することにより、副腎の他、脳幹、小脳においても CA の合成能が増加し、thiamine 欠乏動物に同処置をした場合には、副腎、脳幹、小脳の他、大脳皮質、心房、心室、脾臓等の臓器においても CA の合成能が著明に増加することが認められた。また、CA の合成能は、insulin 投与により、対照群に比し、thiamine 欠乏群の全組織においてより著明に増加することが認められた。また両群の副腎における CA の合成能は、 1 i.u./kg の insulin 投与により、数百倍にまで上昇することが推測される。

前章で、組織内 CA の turnover 速度が膵 β -細胞よりの insulin 遊離を規制していることについて述べたが、この章では逆に、insulin が組織内の CA の turnover を規制していることを明確にし、神経の刺激伝達物質である CA と内分泌ホルモンである insulin の関係、即ち、交感神経系と内分泌系の相互関係のある程度解明したものと考ええる。このように、insulin が、thiamine 欠乏で低下している組織内の CA の turnover を著明に回復することと、第 3 章で述べた、心拍数と組織内特に心臓での CA の turnover とが密接な関係にあることを考慮すると、第 4 章で認めた thiamine 欠乏で低下した心拍数が 1 i.u./kg の insulin により回復するという現象は首肯出来よう。

以上、本研究で明確となった事実を中心に、組織内 CA と insulin の相互関係を示す仮想図を模式的に作成した（第 14 図）。

神経細胞深部の顆粒内で tyrosine より合成された CA は神経細胞の末端部に移行し、その部位における顆粒内に貯蔵される。神経細胞末端部（synaptic terminal）で貯蔵された CA は神経刺激または insulin 刺激により循環中に遊離され、一部は、分解酵素である COMT により不活化され、また一部は、グルクロン酸ならびに硫酸抱合を受け不活化される。他の一部は、CA receptor と結合する。 α -Receptor に結合した CA は、膵 β -細胞よりの insulin

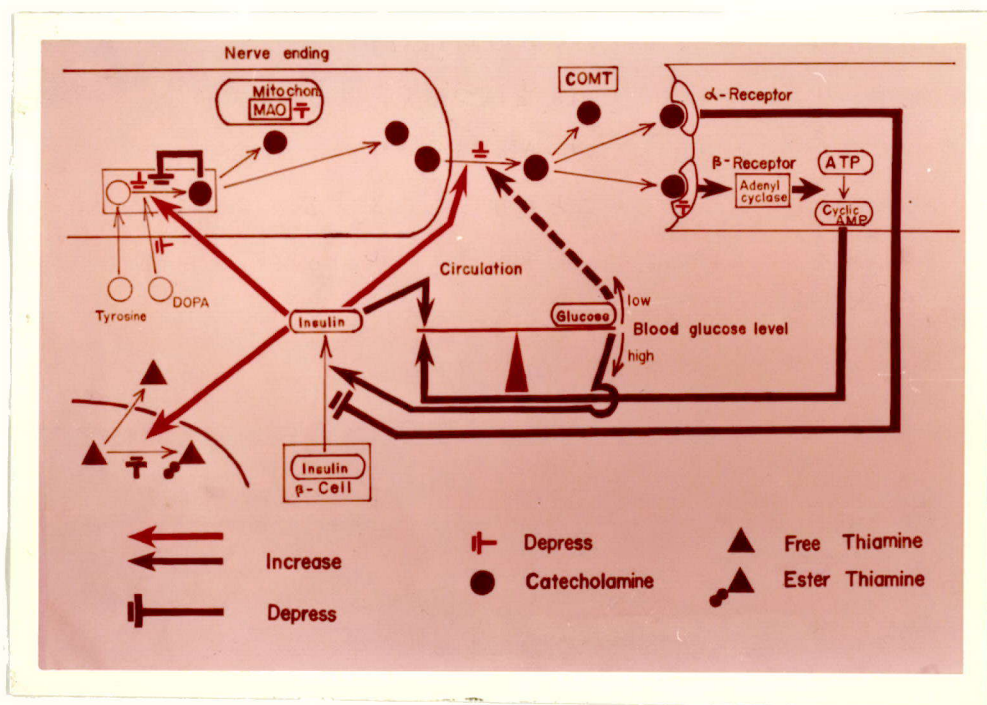
の遊離を阻害する⁷⁷⁾が、 β -receptorに結合したCAは細胞膜のadenyl-cyclase 活性を上昇させ、^{78,79)}細胞内のcyclic 3',5'-AMP含量を増加させ、これが直接または血糖を介して、膵 β -細胞よりinsulinの分泌を促進させる。この分泌されたinsulinが、組織内のCAの合成ならびに遊離(CAのturnover)を促進させる。このように、組織内CAのturnoverは膵 β -細胞よりのinsulinの遊離を制禦するとともに、insulinもまた、CAのturnoverを規制し、更に、CAの両receptorを介してinsulinの遊離を制禦し、生体のhomeostasisを保つべく、互いに調節し合っている。Insulinはまた、cyclic 3',5'-AMPを分解するphosphodiesteraseに直接働きその活性を上昇させることも知られていることから、insulin遊離は、直接血糖を介する作用の他、組織内CAのturnover、 α -receptorならびにcyclic 3',5'-AMPを介して調節されているものと推測される(著者ら⁷⁶⁾は、本論文以外の実験で、血糖値の上昇のみでは、insulinは遊離されにくく、組織内のCAのturnoverならびに β -receptorのCA感受性もinsulin遊離の大きな要素となることを明確にした)。

組織内のthiamine含量が減少すると、このような生体のhomeostasisに変化が生じて、CAの遊離に障害が生じ、且つ β -receptorの感受性も低下し、膵 β -細胞よりのinsulinの遊離にも障害が生じる。このことが組織内のCAのturnoverをより一層低下させ、悪循環を繰り返し、血圧の低下、心拍数の低下ならびに運動量の減少、食慾不振、体温低下、立毛、振顫、旋回、痙攣等の複雑、重症な多発性神経症状が惹起されるものと推測される。

更に、thiamine欠乏動物では、組織内CAのturnoverの低下に起因した、insulin遊離障害の結果、thiamineのエステル化が阻害され、補酵素としての作用減弱も加わり、多発神経症状の発現に大きな影響を与えているものと思われる。一方、thiamine, tyramine等は、thiamine欠乏動物で低下した組織内CAのturnoverを上昇させ、膵 β -細胞よりのinsulinの遊離促進がみられ、これがthiamineのエステル化を促進させるとともに、CAの

turnoverを更に上昇させ、心拍数、血圧も正常に回復し、また運動量の減少、食慾不振、低体温も著明に改善され、振顫、旋回、痙攣等の多発性神経症状も改善されるものと推測される。

Fig. 14.



小 括

- 1) 対照動物に 10 mg/Kg の Catron を腹腔内に投与すると、1 時間後には、血液中の CA 量が著明に減少した。
- 2) Thiamine 欠乏動物に同量の Catron を投与した場合には、1 時間後に、血液中の CA 量の変動は認められなかった。
- 3) 対照動物に 1 i.u. /Kg の insuline を腹腔内に投与すると、5 時間後に、脳幹、小脳、副腎、血液中の CA 量が減少した。一方、心房、心室では逆に

CAの増加がみられた。

- 4) 対照動物に同量の insulin を投与した1時間後では、血液中のCAは 45 ng/ml と著明に増加した。
- 5) Thiamine 欠乏動物に同量の insulin を投与すると、5時間後において、大脳皮質、脳幹、小脳、脾臓、副腎のCA量が著明に減少し、心房、心室においては、CA量の変動は全くみられなかった。
- 6) Thiamine 欠乏動物に同量の insulin を投与し、1時間後では、血液中のCAは 22 ng/ml と増加した。
- 7) 対照動物に同量の insulin を投与すると、5時間後で、脳幹、小脳、副腎で著明にCAの合成能が増加した。
- 8) Thiamine 欠乏動物に同量の insulin を投与した場合、5時間後で、大脳皮質、脳幹、小脳、心房、心室、脾臓ならびに副腎においてCAの合成能が著明に増加した。
- 9) Insulin による組織内のCA合成能の促進作用は、全組織において、対照群に比較して、thiamine欠乏群で、より著明であった。

結

論

Thiamin 欠乏ラットの大脳皮質、心房、心室、脾臓等の臓器において著明にCAが増加していることが認められ、この増加は主として、神経刺激伝達物質であるNAであることを明確にした。このCAの増加は、分解酵素であるMAO活性の抑制ならびに循環中へのCA遊離の減少に起因することを明確にした。更に欠乏動物各組織内CAのturnoverの減少を認め、これが脾 β -細胞よりのinsulin遊離に障害を与え、このinsulin遊離の障害が、更に組織内のCAのturnoverを一層減少させ、これが悪循環を繰り返して、血圧の低下、心拍数の減少、運動失調、運動量の減少、立毛、体温の低下、振顫、旋回、痙攣等の多発性神経症状を惹起する大きな要因となることを明確にした。

本研究は、自律神経系-内分泌系-物質代謝の調節機構の関連を追求する一連の研究の一端をなすもので、これらの関連性を詳細に検討して、thiamine欠乏動物でみられる。重症、複雑な多発神経症状を、代謝調節の変化を明確にすることにより、解明しようとしたものである。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った岩田平太郎教授に衷心より感謝致します。また本実験に適切なる御助言、御協力をいただいた大阪大学薬学部薬理学教室の諸氏に心より感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Eijkman, C.; Virchows Arch. path. Anat., 148, 523 (1897)
- 2) von Muralt, A.; Experientia, 1, 136 (1945)
- 3) von Muralt, A.; Ann. N. Acad. Sci. 98:Art., 2, 499 (1962)
- 4) Hoffman, T., Eckelt, T. & Möbus, W.; Hoppe -Seyler's Z. Physiol. Chem., 335, 156 (1964)
- 5) Eckert, T. & Möbus, W.; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 338, 286 (1964)
- 6) Gurtner, H. P.; Helv. Phys. Pharm. Acta, XI Suppl. (1961)
- 7) Cooper, J. R., Roth, R.H. & Kini, M. M.; Nature, 199, 609 (1963)
- 8) Mann, P. J. G. & Quastel, J. H.; Nature, 145, 356 (1940)
- 9) Glick, D. & Antopol, W.; J. Pharmacol., 65, 329 (1939)
- 10) Sullmann, W. & Birkhäuser, H.; Schweiz. Med. Wochschr., 69, 648 (1939)
- 11) Lissak, K., Kovacs, T. & Nagy, E. K.; Pflüger's Arch. Ges. Physiol., 247, 124 (1943)
- 12) Bhagat, B. & Lockett, M. F.; J. Endocrin., 23, 237 (1961)
- 13) Iwata, H.; Abstracts of Papers Presented at XXIII International Congress of Physiological Sciences, Sep. (1966)

- 14) Crout, J. R.; Creveling, C.R. & Udenfriend, S.;
J. Pharmacol., 132, 269 (1961)
- 15) Euler, U. S. V. & Hamberg, U.; Science, 110, 381
(1949)
- 16) Persky, H. & Roston, S.; Science, 118, 381 (1953)
- 17) Euler, U. S. V. & Floding, I.; Acta physiol. scand.
33 (Suppl. 118), 57 (1955)
- 18) Lowry, C. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. &
Randall. R. J.; J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
- 19) Bogdanski, D. F., Pletscher, A., Brodie, B. B. &
Udenfriend, S.; J. Pharmacol. 117, 82 (1956)
- 20) Udenfriend, S., Weissbach, H. & Brodie, B. B.;
Meth. Biochem. Anal., 6, 95 (1958)
- 21) Linét, O., Widhalm, S. & Hertting, G.; Int. J.
Neuropharmacol., 6, 337 (1967)
- 22) Kinnersley, H. W. & Peters, R. A.; Biochem. J., 23,
1126 (1929)
- 23) Peters, R. A., Gavilescue, N., Meiklejohn, A. P. &
Passmore, R.; Proc. Roy. Soc. London, B 110, 430
(1932)
- 24) Platt, B. S. & Lu, G. D.; Biochem. J., 33, 1525
(1939)
- 25) DeJong, S.; Arch. Neerl. Physiol., 21, 465 (1936)
- 26) Kopin, I. J.; Pharmacol. Rev., 16, 179 (1964)
- 27) Kopin, I. J. & Gordon, E.k.; J. Pharmacol., 138,
351 (1962)
- 28) Richter, D.; J. Physiol., 98, 361 (1940)

- 29) Axelrod, J., Hertting, G. & Patrick, R. W.;
J. Pharmacol., 134, 325 (1961)
- 30) Cotzias, G. C. & Dole, V. P.; J. Biol. Chem., 190,
665 (1951)
- 31) Tokawa, T. & Takahashi, R.; Jap. J. Neurochem., 5,
5 (1966)
- 32) Taniguthi, K., Kakimoto, Y. & Armstrong, M. D.;
J. Lab. Clin. Med., 64, 469 (1964)
- 33) DeRobertis, E.; Histophysiology of synapses and
neurosecretion. Pergamon Press, Oxford (1964)
- 34) Gal, E. M. & Drewes, F. A.; Proc. Soc. exp. Biol.
Med., 106, 295 (1961)
- 35) Vendsalu, A.; Acta Physiol. Scand. 49, suppl., 173
(1960)
- 36) Udenfriend, S. & Weissbach, H.; Proc. Soc. exp.
Biol. Med., 97, 748 (1958)
- 37) Spector, S. Hirsch, C. W. & Brodie, B. B.;
J. Neuropharmacol, 2, 81 (1963)
- 38) Kulkarni, A. S. & Shideman, F. E.; Europ. J.
Pharmacol, 3, 269 (1968)
- 39) Iwata, H., Nishikawa, T. & Baba, A.; Europ. J.
Pharmacol. in press
- 40) Ahlquist, R. P.; Am. J. Physiol. 153, 586 (1948)
- 41) Ahlquist, R. P. & Levy, B.; J. Pharmacol., 127, 146
(1959)
- 42) Furchgott, R. F.; Pharmacol. Rev., 11, 429 (1959)

- 43) Dikstein, S. & Sulman, F. G.; Biochem. Pharmacol., 14, 881 (1965)
- 44) Jenkinson, D. H. & Morton, I. K. M. ; J. Physiol., 188, 373 (1967)
- 45) Edman, K. A. P. & Schild, H. O.; J. Physiol., 169, 404 (1963)
- 46) Jenkinson, D. H. & Morton, I. K. M.; J. Physiol., 188, 387 (1967)
- 47) Schild, H. O.; Pharmacol. Rev., 18, 495 (1966)
- 48) Sutherland, E. W. & Cori, C. F.; J. Biol. Chem., 188, 531 (1951)
- 49) Hubbard, R. S. & Wright, F. R.; J. Biol. Chem., 49, 385 (1921)
- 50) Carter, R. C. W. & Drury, A. N.; J. Physiol., 68, 1 (1929)
- 51) Peters, R. A. & Wakelin, R. W.; J. Physiol., 119, 421 (1953)
- 52) Peters, R. A.; Brit. Med. Bull., 9, 116 (1953)
- 53) Morris, D. L.; Science, 107, 254 (1948)
- 54) Axelrod, J.; Biogenic amines (Progress in brain research, 8), 81 (1964)
- 55) Aebi, H., Stocker, F. & Eberhardt, M.; Biochem. Z., 336, 526 (1963)
- 56) Izumi, F., Oka, M., Yoshida, H. & Imaizumi, R.; Life Sci., 6, 2333 (1967)
- 57) Nukada, T., Sakurai, T. & Imaizumi, R.; Jap. J. Pharmacol., 13, 124 (1963)

- 58) Itoh, T., Matsuoka, M., Nakazima, K., Tagawa, K. & Imaizumi, R.; Jap. J. Pharmacol., 12, 130 (1962)
- 59) Kopin, I. J. & Gordon, E. K.; J. Pharmacol., 140, 207 (1963)
- 60) Axelrod, J.; Pharmacol. Rev., 18, 108 (1966)
- 61) Potter, L. T. & Axelrod, J.; Nature, 194, 581 (1962)
- 62) Burn, J. H. & Rand, M. J.; J. Physiol., 144, 314 (1958)
- 63) Trendelenburg, U.; J. Pharmacol., 134, 8 (1961)
- 64) Matsuoka, M.; Jap. J. Pharmacol., 14, 181 (1964)
- 65) Spector, S., Kuntzman, R., Shore, P. A. & Brodie, B. B.; J. Pharmacol., 130, 256 (1960)
- 66) Costa, E., Cessa, G. L., Hirsch, C., Kuntzman, R. & Brodie, B. B.; Ann. N. Y. Acad. Sci., 96, 118 (1962)
- 67) Rindie, G., Perri, V. & Ferrari, P.; Z. Vitaminforsch., 24, 66 (1955)
- 68) 森 川 勤 ; 日新医学, 37, 396 (1950)
- 69) 森 川 勤 ; 新潟医学会雑誌, 64, 249 (1950)
- 70) 藤原元典, 松井清夫 ; ビタミン, 6, 143 (1953)
- 71) Monta, I. & Gorn, V.; Fiziol. Norm. Patol., 10, 437 (1964)
- 72) Garland, H.; Brit. med. J., 2, 1287 (1955)
- 73) Rubin, A. & Babbott, D.; J. Amer. med. Ass., 168, 498 (1958)
- 74) Martin, M. M.; Lancet, 1, 560 (1953)

- 75) Berge, K. G., Sprague, R. G. & Bennet, W. A.;
Diabetes, 5, 286 (1956)
- 76) 西川 殷 維 , 馬 場 明 道 , 河 村 恒 子 , 岩 田 平 太 郎 ;
日本薬学会第90年会発表 (1970年7月)
- 77) Boda, B. & Porte, K.; Diabetes, 16, 150 (1967)
- 78) Sutherland, E. W. & Rall, T. W.; Pharmacol. Rev.,
12, 265 (1960)
- 79) Bueding, E., Butcher, R. W., Hawkins, J., Timms,
A. W. & Sutherland, E. W.; Biochem. Biophys. Acta.,
115, 173 (1966)