



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ThiamineおよびDhydrothiamineの代謝研究                                                                                                                  |
| Author(s)    | 岡田, 幸蔵                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1960, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/28342">https://hdl.handle.net/11094/28342</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【 2 】

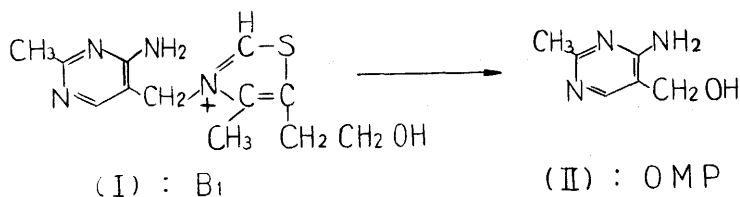
|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| 氏 名・(本籍)    | 岡 田 幸 蔵<br>おか だ こう ぞう                 |
| 学 位 の 種 類   | 薬 学 博 士                               |
| 学 位 記 番 号   | 第 143 号                               |
| 学位授与の日付     | 昭 昭 35 年 11 月 17 日                    |
| 学位授与の要件     | 薬学研究科応用薬学専攻<br>学位規則第5条第1項該当           |
| 学 位 論 文 題 目 | Thiamine および Dihydrothiamine の代謝研究    |
| 論文審査委員      | (主 査) 教授 川崎近太郎 (副 査) 教授 羽野 寿 教授 上原喜八郎 |

論 文 内 容 の 要 旨

ビタミン B<sub>1</sub> (Ⅰ：以下 B<sub>1</sub> と略記) の生体内における作用機構を明らかにする基礎研究として生体内における B<sub>1</sub> の変化を追求し、さらに B<sub>1</sub> 類似体の生物学的効力や代謝状況を比較し以下の成績を得た。

I B<sub>1</sub> の尿中代謝産物 (ピラミン) の単離および確認

B<sub>1</sub> の尿中代謝物ピラミンの本体について従来 B<sub>1</sub> のピリミジン体であろうとの推定にとどまっていたが、著者は大量の B<sub>1</sub> 服用者尿を処理してピラミンが 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (Ⅱ：以下 OMP と略記) であることを薄紙クロマトグラフィーその他で証明すると共に本物質を 2, 4-Dinitrophenyl 誘導体として単離確認することができた。ピラミンが OMP であり、B<sub>1</sub> より毒性の強い物質であることが明らかにされ、本物質が生物に対してビタミン B<sub>6</sub> と拮抗するトキソピリミジンであるが、B<sub>1</sub> 類似体に比べ B<sub>1</sub> は動物体内で安定であって OMP 生成量が少ないのでその毒性を問題とするには至らない。



II Dihydrothiamine の代謝および尿中代謝産物の解明

B<sub>1</sub> の還元体である Dihydrothiamine (Ⅲ：以下 DHB<sub>1</sub> と略記) はその化学的合成が比較的生理的に近い条件で行われる点から天然における B<sub>1</sub> 生合成の前駆物質となりうるとの仮説があるが実証されていない。著者は DHB<sub>1</sub> の生物学的意義を解明する目的で諸種の実験を行い次の諸点を明らかにすること

ができた。

(1) DHB<sub>1</sub> 結晶に3種の異性体 (Ⅲ), (Ⅳ), (Ⅴ)があるが, 水溶液ではいずれも B<sub>1</sub> のジヒドロ体(Ⅵ)の形に加水分解されると思われるので normal-DHB<sub>1</sub> を用いその化学的微量定量法について検討した。

DHB<sub>1</sub> を硫酸酸性で FeCl<sub>3</sub> 酸化して B<sub>1</sub> としこの B<sub>1</sub> を常法に従って定量する FeCl<sub>3</sub> 法を案出し, B<sub>1</sub> の生成量は DHB<sub>1</sub> 0~12.5rで直線関係を示した。DHB<sub>1</sub> 異性体よりの B<sub>1</sub> 生成度は pseudo-DHB<sub>1</sub> (Ⅴ) > iso-DHB<sub>1</sub> (Ⅳ) ≥ normal-DHB<sub>1</sub> (Ⅲ) の順で pseudo- 体がもっともよい。この方法を利用して DHB<sub>1</sub> 水溶液の安定性を調べた結果 DHB<sub>1</sub> は各異性体とも濃厚液およびアルカリ性溶液で安定であるが希薄溶液とくに酸性で不安定となり24時間後に約1/10以下に減少した。また DHB<sub>1</sub> 異性体の希薄水溶液の室温における安定度は iso-体 > normal- 体 > pseudo- 体の順で pseudo- 体がもっとも不安定であるが, 酸性, アルカリ性水溶液および純アルコール溶液では3異性体の間に安定度の差はほとんどみられなかった。

DHB<sub>1</sub> に酢酸酸性で過酸化水素を作用させても B<sub>1</sub> を生成せず normal- 体, pseudo- 体のいずれからでも 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine 硫酸塩(Ⅶ)が得られた。また DHB<sub>1</sub> は弱酸性ないし中性付近で亜硫酸分解を受け易いがアルカリ性では分解されにくい。これらの点から DHB<sub>1</sub> は酸性溶液中で B<sub>1</sub> と同様第4級アンモニウム塩の形(Ⅷ)で存在するものとおもわれる。他方 DHB<sub>1</sub> のアルカリ性水溶液を長時間放置するか加熱するとチオールの反応が陽性となりニトロプルシド法およびポーログラフィーによってチオールの確認, 定量を行いアルカリ性溶液で DHB<sub>1</sub> がチオール形(Ⅸ)をとるかあるいはさらにチオール化合物へ分解する可能性のあることを示した。

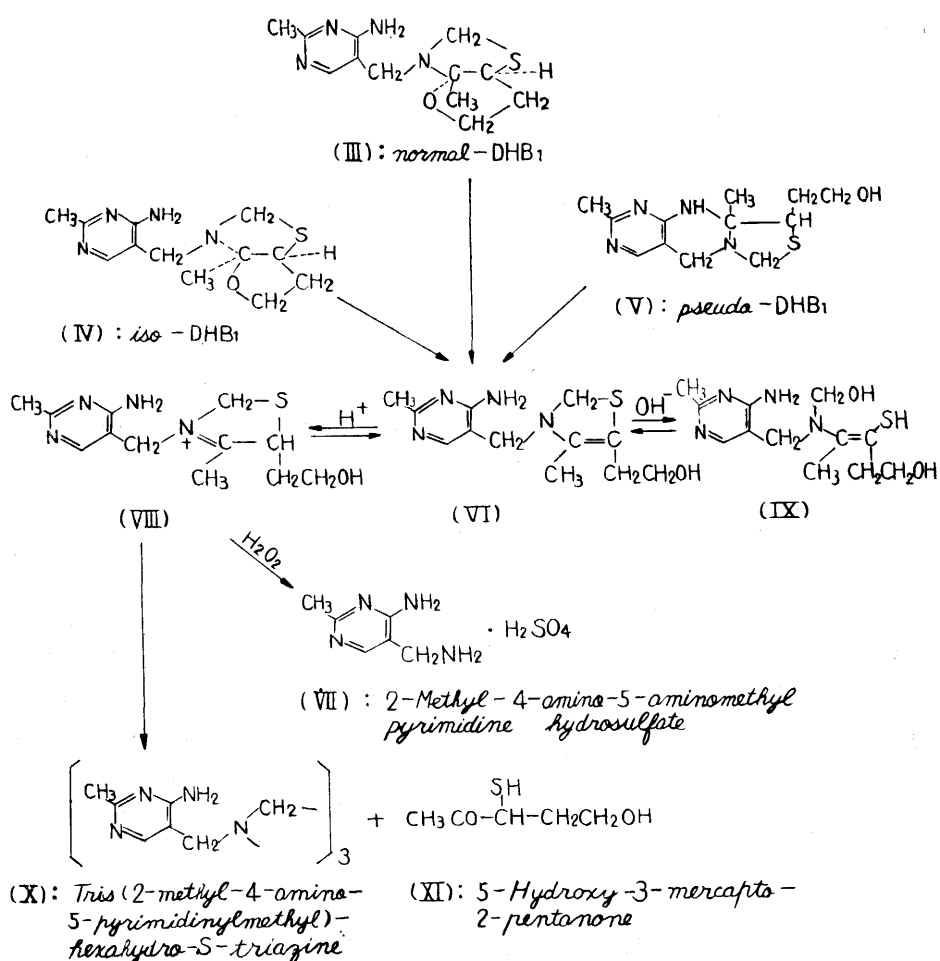
(2) DHB<sub>1</sub> の動物体内での変化をみるため in vitro で諸種の動物臓器ホモジネートとの反応を行い, シロネズミ, モルモット, 牛の肝臓および腎臓, 脾臓などに DHB<sub>1</sub> から B<sub>1</sub> を生成する酵素性因子の存在することを確認した。本因子は pH 4.5に至適 pH を有し, 易熱性, 硫酸アンモニウムで塩析され, アセトン処理で活性の大部分は沈澱部分に集まる。また透析により蛋白部分(アポ酵素)と低分子の物質(補酵素)とに分離され, シアンカリ, ナトリウムアチド, モノヨード酢酸などで作用が阻害される。本酵素は最適条件(pH 4.5, 37°, 5時間以上)における反応で DHB<sub>1</sub> の約10~15%を B<sub>1</sub> に転移するが同時に DHB<sub>1</sub> の分解も起る。(3)に記す動物実験の結果と比較して本酵素が動物体内で直接 DHB<sub>1</sub> に作用する可能性は極めて少ないと思われる。

動物組織以外に植物組織においても DHB<sub>1</sub> を酸化する酵素の存在が予測されたが, わきびのペルオキシダーゼが過酸化水素の存在でまた大豆から得たりポキシダーゼとリノール酸の反応で生成した過酸化物がいずれも DHB<sub>1</sub> を部分的に B<sub>1</sub> へ酸化する能力のあることを認めた。パン酵母より抽出した主としてアルコール脱水素酵素含有の粗酵素液は DHB<sub>1</sub> に対しなら認むべき作用を示さなかった。

(3) シロネズミを使用して B<sub>1</sub> 欠乏症予防試験ならびに治癒試験の両面から DHB<sub>1</sub> の生物学的効力(B<sub>1</sub> 効力)を調べた結果 DHB<sub>1</sub> の投与方法によって著しい差異のあることが判明した。すなわち非経口投与時には DHB<sub>1</sub> にほとんど B<sub>1</sub> 効力が認められなかったが, 経口投与時にはかなり著明な B<sub>1</sub> 効力を示しその際の動物諸臓器中 B<sub>1</sub> 測定値もこれらの観察によく一致していた。経口投与時の B<sub>1</sub> 効力は DHB<sub>1</sub> が消化管(主として胃)通過時に酸性消化液ならびに食物消化物などと好氣的状態で反応してその一部が

B<sub>1</sub> へ移行するためであることを人工消化液その他による *in vitro* の実験で証明した。なお DHB<sub>1</sub> 投与後の糞便中の B<sub>1</sub> 排泄増加度も経口投与時の方が大きく上記の成績をさらに裏づけている。

(4) 以上の結果から DHB<sub>1</sub> 自体は動物体内で B<sub>1</sub> 活性物質になりがたいといえるがその理由の一つは DHB<sub>1</sub> が生体内ではなほだ分解され易いことである。動物臓器ホモジネートとの反応で DHB<sub>1</sub> は容易に分解されるが、DHB<sub>1</sub> の大量をシロネズミに腹腔内投与した際の尿中への排泄率も極めて低い。このようなシロネズミの尿より Tris (2-methyl-4-amino-5-pyrimidinylmethyl) hexahydro-s-triazine (X) および 5-Hydroxy-3-mercapto-2-pentanone (XI) を DHB<sub>1</sub> の主要代謝物として分離確認し動物体内における DHB<sub>1</sub> の主要代謝経路を明らかにした。この他ビタミン B<sub>1</sub> 関連化合物の毒性試験を行い誘導体の毒性とその尿中代謝産物の毒性との間に関連のあることを示した。



## 論文の審査結果の要旨

本研究はビタミン B<sub>1</sub> およびその関連化合物の動物体内における代謝産物の究明を目的としたもので、尿中 B<sub>1</sub> の代謝産物として「Pyramin」が報告されているがその本態が未決定である。B<sub>1</sub> 誘導体として易吸収性である Dibenzoylthiamine を選び、その大量服用者の尿を処理して主代謝産物を分離し、汙紙クロマトグラフィーおよびジニトロフェニル誘導体の単離により本品が 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine であることを確定した。

次にビタミン B<sub>1</sub> の前駆体と予想される Dihydrothiamine (DHB<sub>1</sub>) について本物質の定量法、安定度、化学的变化、生化学的变化を研究した。定量法として FeCl<sub>3</sub> による酸化により B<sub>1</sub> とし常法により測定する方法を案出し、DHB<sub>1</sub> がアルカリ性で安定で酸性で極めて不安定であることを明らかにし、安定度においてビタミン B<sub>1</sub> と著しく異なるものであることが判った。動物体内での変化をみるため肝、腎等のホモジネートと反応させると pH 4.5 附近で DHB<sub>1</sub> より B<sub>1</sub> を生成する酵素因子が存するがその生成量は微少であり、一方 DHB<sub>1</sub> の大部分はホモジネートとの接触により非酵素的に分解され、特に酸性においての蛋白質との接触による分解が顕著である。B<sub>1</sub> 欠乏食を与えたシロネズミに DHB<sub>1</sub> を投与し成長促進性を B<sub>1</sub> のそれと比較すると経口投与では 1 日 50r で有効であったが、皮下注射では 1 日 410r でも効力を示さなかった。このように投与方法の差による効力の差は消化管の通過により非酵素的に DHB<sub>1</sub> の一部が B<sub>1</sub> に酸化されるのであることを in vitro の実験で証明し、DHB<sub>1</sub> そのものは B<sub>1</sub> 効力(成長促進性)を有しないことを明らかにした。DHB<sub>1</sub> の大量をネズミに投与すると尿中に Tris-(2-methyl-4-amino-5-pyrimidinylmethyl)-hexahydro-s-triazine として排泄され、DHB<sub>1</sub> の大部分が体内で分解される。B<sub>1</sub> および DHB<sub>1</sub> の動物体内での分解はそれぞれ B<sub>1</sub>、DHB<sub>1</sub> の酸加水分解産物と同じものを生ずるが、B<sub>1</sub> は極めて安定で分解産物の生成量が少いに反し DHB<sub>1</sub> の動物体内での分解の大きいことは DHB<sub>1</sub> の性状ならびに in vitro の実験成績から考えてうなずくことができる。

本研究によって(1)尿中 B<sub>1</sub> の代謝産物(Pyramine)の本態を明らかにし、(2) DHB<sub>1</sub> の性状、定量法、生化学的变化を研究し、(3) DHB<sub>1</sub> が B<sub>1</sub> 効力を有すると発表された従来の成績が DHB<sub>1</sub> 本来の効力ではなく B<sub>1</sub> への非酵素的酸化によるものであることを証明し、(4) DHB<sub>1</sub> の代謝産物の分離証明を行った。

これらの研究成績によってビタミン B<sub>1</sub> および DHB<sub>1</sub> の代謝を明確ならしめビタミン研究上重要な新知見を得たものである。