



Title	Tryptophanの酵素的微量定量法 : 附妊娠家兔アミノ酸尿に及ぼすVB6の影響に就いて
Author(s)	関, 久義
Citation	大阪大学, 1961, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28399
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	関	久	義
	せき	ひさ	よし
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	第	224	号
学位授与の日付	昭 和 36 年 8 月 1 日		
学位授与の要件	医 学 研 究 科 外 科 系		
	学位規則第 5 条第 1 項該当		
学 位 論 文 題 目	Tryptophan の酵素微量定量法 一附妊娠家兎アミノ酸尿に及ぼす VB ₆ の影響に就いて一		
	(主 査)	(副 査)	
論 文 審 査 委 員	教 授 足 高 善 雄	授 教 西 沢 義 人	教 授 須 田 正 己

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

各種アミノ酸の定量法の中で Tryptophan (以下 Try. と略す) の特異的定量法は最も困難なものの一つであり、現在迄ひろく行われている Aldehyde 試薬を用いる光電比色法及び微生物定量法は夫々一長一短があり、然も Try. のみを特異的に定量することはできない。ここに著者は遊離の Try. のみを特異的に定量しうる Frank & DeMoss の酵素的定量法に改変を加え、より微量の Try. を正確に定量しうる方法について検討し、まず本研究の開始に際して此方法を尿中 Try. の定量に応用しうるように工夫した。著者の測定法を用いて妊娠時に於いて特異的に尿中排泄量の増加することが知られている。Try., Histidine (以下 Hist. と略す) と妊娠時蛋白代謝に関係の深い V.B₆ との関連性について実験的研究を行った。

方法並びに成績

(1) Try. の酵素的定量法 (Frank & DeMoss の方法と著者の改変法の比較)

Try. の酵素的定量には Enzyme source として本学生化学教室保存の Escherichia coli K₁₂ strain の抽出液の供与をうけて使用した。Frank & DeMoss の方法では Try. の酵素反応液層上に重層した Toluene 層の一部のみをとり、その中に含まれる Indole を p-Dimethylaminobenzaldehyde 及び Acid-Alcohol で発色せしめるが、著者の方法では反応層及び Toluene 層全層に石油エーテルを重層し、石油エーテルと Toluene の混和層に Ehrlich の Aldehyde 試薬を加えて Indole を発色せしめるのであって、その吸光度は同一量の Try. に対しては Frank & DeMoss の方法に比して約8倍増大し、Frank & DeMoss の方法では測定可能の最小量は 0.04 μ M であるが、著者の方法では 0.01 μ M 迄測定可能であり、本改変法では Try. 量が上限界 0.1 μ M 迄吸光度が Lambert-Beer 氏法則を満足せしめることを知った。又 Frank & De-Moss の方法では吸光度は発色後 5~10分で最大となり、其後速に減弱するのに

反し、著者の改変法では発色後5分で最大となり、其後1時間後迄殆んど呈色の変動はみられなかった。

尿中 Try. の定量には濾過尿 5 cc に水 5 cc 及び 10% 酢酸 0.3 cc を加え、100°C、10 分間煮沸した後 16.0 00rpm で 10 分間遠沈し、上清を 20 cc に稀釈し、その 1 cc を定量に使用した。著者の方法による人尿及び家兎尿での Try. 回収率は夫々 96~100%, 97~101% であった。

(2) 妊娠家兎アミノ酸尿に及ぼす V.B₆ の影響

実験動物はすべて体重 2500g 以上の成熟雌性家兎を用いた。

1) 妊娠家兎に於ては全尿中 Try., Hist., Xanthurenic acid (以下 XA. と略す) 量は妊娠第 10 日前後より次第に増加し第 18~20 日頃急激に増加し、第 20~25 日頃より急激に減少して、分娩後は殆んど非妊時の値に復した。

2) 妊娠第 18~20 日の家兎 6 羽、非妊家兎 5 羽に夫々 DL-Tryptophan 1 g を経口負荷すれば、妊娠家兎では全尿中 Try. 排泄増加量は平均 309 μ M (投与前平均 2.93 μ M, 投与後平均 6.02 μ M), 非妊家兎では平均 0.16 μ M の増加 (投与前平均 0.39 μ M, 投与後平均 1.0 μ M) で、全尿中 XA. 排泄増加量については、妊娠家兎で平均 3.82 mg (投与前平均 3.13 mg, 投与後平均 6.95 mg) で、非妊家兎では平均 0.11 mg (投与前平均 0.78 mg, 投与後平均 0.89 mg) の増加を示した。

3) 妊娠第 14~16 日の家兎 6 羽、非妊家兎 5 羽に pyridoxine 40 mg/day を 3 日間計 120 mg を筋注すれば、妊娠家兎では全尿中 Try. 排泄量の減少は平均 2.50 μ M (投与前平均 4.21 μ M, 投与後平均 1.71 μ M, 59.5% 減少) 非妊家兎では平均 0.15 μ M (投与前平均 0.40 μ M, 投与後平均 0.25 μ M, 38% 減少) で、全尿中 XA. 排泄量の減少は妊娠家兎では平均 3.67 mg (投与前平均 5.92 mg, 投与後平均 2.25 mg, 62.0% 減少), 非妊家兎では平均 0.78 mg (投与前平均 1.05 mg, 投与後平均 0.27 mg, 74% 減少) であった。妊娠家兎に於て更に Pyridoxine 40 mg と Try. 1 g を追加投与すれば、全尿中 Try. 排泄増加量は平均 1.09 μ M で Pyridoxine 非投与に於て Try. を負荷したときの夫れが、平均 3.09 μ M であったのに比べ僅かであった。XA. の排泄増加量についても同様に Pyridoxine 投与時には平均 1.34 mg で非投与に於て Try. を負荷したときのそれが平均 3.82 mg であったのに比し僅かであった。然し Hist. 排泄量は Pyridoxine 投与によって殆んど影響を認めなかった。

4) Desoxypyridoxine (以下 D-p. と略す) を非妊家兎 4 羽に夫々 30 mg/day 6 日間計 180 mg 筋注すれば、全尿中 Try. 排泄増加量は平均 1.67 μ M (投与前平均 0.88 μ M, 投与後平均 2.55 μ M, 190% 増加) で、XA. についても同様に、平均 1.93 mg 増加 (投与前平均 0.74 mg, 投与後平均 2.67 mg, 261% 増加) した。更に D-p 30 mg と Try. 1 g を追加投与すれば、Try. では 3.16 μ M (投与前平均 2.55 μ M, 投与後平均 5.71 μ M, 124% 増加) XA. では 3.34 mg (投与前平均 2.67 mg, 投与後平均 6.01 mg, 125% 増加) の排泄量増加を示した。又 Hist. 排泄量は D-p. 180 mg 投与により 0.94 μ M の減少 (投与前平均 2.80 μ M, 投与後平均 1.86 μ M, 33.6% 減少) を認めた。

総 括

(1) Frank & DeMoss による Try. 酵素的定量法に工夫を加え、0.01 μ M の微量より 0.1 μ M 迄の free L-Tryptophan の定量を行うことができるのみならず、更に尿中の微量 Try. 量を測定することができるようになった。

(2) 妊娠家兎に於て認められるアミノ酸尿の中, Try. の排泄増加は Hist. とは別個に妊娠時の V.B₆ 欠乏状態と一定の関係のあることを実験的に認めた。

論文の審査結果の要旨

Tryptophan (以下 Try. と略す) の特異的定量法は各種アミノ酸中最も困難なものの一つである。著者は遊離の Try. のみを特異的に定量しうる Frank & DeMoss (1957) の酵素的定量法に改変を加え, より微量の Try. を正確に定量し得る方法について検討し, 更に之を尿中 Try. の定量に応用しうるように工夫した。

まず著者は Frank & DeMoss の Toluene に依る Indole の抽出法を石油エーテルを用いることによって改変を加え, 約 $0.01\mu\text{M}$ より $0.1\mu\text{M}$ 迄の微量の遊離 Try. の定量を可能とし, 次いで人尿及び家兎尿中の Try. 定量において本法の回収率が夫々96~100%, 97~101%の略々満足すべき成績を得た。

この方法を用いて, 妊娠時に尿中排泄量が特異的に増加する Try. と妊娠時蛋白質代謝に関係の深い V.B₆ との関連性について検索し併わせて妊娠時に増量する Histidine (以下 Hist. と略す) 尿の催生原因をVB₆ との関連においてアミノ酸代謝の面より研究している。

1) 著者の方法により妊娠家兎全尿中 Try. を, 又瀬良 (1939) の方法により Hist. を, Wachstein (1952) の方法により Xanthurenic acid (以下 XA. と略す) を妊娠初期より逐日的にその動向を検べ, 妊娠時には何れも増量するのを認め,

2) 妊娠第18~20日目の家兎に DL-Tryptophan 1g を経口投与したときの全尿中 Try., XA. の排泄増加量は夫々平均 $3.09\mu\text{M}$, 3.82mg で投与前に比し有意の差を以て増量し, 非妊家兎に投与したときは夫々平均 $0.61\mu\text{M}$, 0.11mg で妊娠時とは有意の差のあることを認めている。

3) 妊娠第14~16日目の家兎に Pyridoxine 120mg を筋注したときの全尿中 Try., XA. の排泄減少量は夫々平均 $2.50\mu\text{M}$ (59.5%減) 3.67mg (62.0%減) で投与前に比し有意差を以て減少し, 更に Pyridoxine 40mg と Try. 1g を追加投与しても全尿中 Try., XA. の排泄増加量は夫々平均 $1.09\mu\text{M}$, 1.34mg で Pyridoxine の非投与時に比べ僅少であった。

尚Hist. 排泄量は Pyridoxine 投与により影響を認めなかった。

4) Desoxypyridoxine 180mg を非妊家兎に筋注して Try., XA. 排泄増加量が夫々平均 $1.67\mu\text{M}$ (190%増), 平均 1.93mg (261%増) と投与前に比し有意の差を認めたが, Hist. 排泄量には殆んど変化を認めなかった。

以上の動物実験により, 妊娠家兎に於いて認められるアミノ酸尿中, Hist. 排泄増加の機序とは異なり (Try. 排泄増加は妊娠時の V.B₆ 低下状態と一定の関係があり, 且つ Try. 尿催生機序の一端を明らかにしたものと考えられる。