Osaka University Knowledge Archive

Title	Thiamineのスルホン酸エステルおよび硫酸エステルに関する研究
Author(s)	富田, 勲
Citation	大阪大学, 1962, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28531
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【3】

氏　名・(本籍)	富　田　勲（とみ　た　いさお）
学位の種類	薬　学　博　士
学位記番号	第　351　号
学位授与の日付	昭和37年11月7日
学位授与の要件	薬学研究科　応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**Thiamine のスルホン酸エステルおよび硫酸エステルに関する研究**
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

Benzenesulfonyl chlorideの作用による Thiamine(Ⅰ)→Thiamine anhydride(Ⅱ)（TAと略記）の生成反応における中間化合物として Benzenesulfonylthiamine disulfide (Ⅳ) および Benzenesulfonylthiamine(Ⅴ) (BST) を製し，両化合物から TA への変化を研究し，TA 生成機構の解明を試みた。つぎに BST ならびに Thiamine sulfuric ester(TSE) について，動物体内での Thiamine の存在形を検討する手がかりを得る目的で，それらの代謝，生物学的活性，抗 Thiamine 効果などについて検討し次のごとき結果を得た。

[1] Thiamine より TA の生成反応

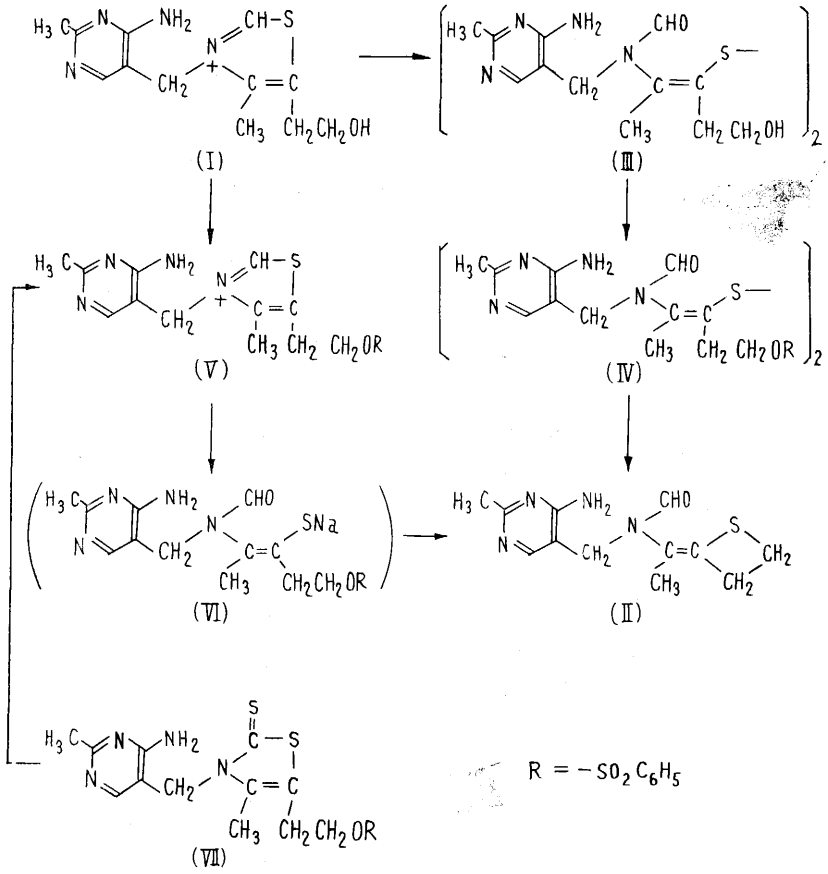
Thiamine のアルカリ溶液に Benzenesulfonyl chloride を反応させると TA が得られるが，この反応を冷却して行なうと Thiamine disulfide (Ⅲ)，Benzenesulfonylthiamine disulfide (Ⅳ) が各々結晶状に得られ，反応液中にはこのほか Thiamine(Ⅰ)，2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅹ)，TA(Ⅱ) 構造未知の蛍光物質が微量存在することが確認された。この反応で分離された (Ⅳ) はエタノール中希アルカリの存在で TA を生成し，また Thiamine を予め酸化して Thiamine disulfide (Ⅲ) とし，次に Benzenesulfonyl chloride を作用させても TA が得られるので，この反応は Thiamine(Ⅰ)⟶ Thiamine disulfide (Ⅲ) ⟶ Benzenesulfonyl thiamine disulfide(Ⅳ)⟶TA (Ⅱ) の順で行なわれるものと推定した。

次に各種濃度 (0.1～1000mg%) の Thiamine 溶液について本反応を検討すると TAのほかに Thiamine disulfide(Ⅲ)，Benzenesulifonylthiamine disulfde(Ⅳ) の存在が認められたが，上述の場合に比べ，これら TA 以外の物質の生成度が小であった。特にThiamineの定量に使用されるような濃度では，これら中間体の存在が認められず Thiamine⟶TAの反応が完全に行なわれている。Thiamine に直接 Benzenesulfonyl chloride を反応させてもBSTが得られないが，Thiothiamineの0-sulfonylester の酸化により収量よく BST が合成できたので，BST⟶TA の反応を検討した。

BST から TA への反応は pH7以上で容易に起り，強アルカリ性域では瞬間的に行なわれ，Benzenesul-

fonylthiamine disulfide⟶TAの反応に比べ，より容易に TA を生成することが判明した。

Thiamine より TA の生成経路をまとめるとつぎに示す通りであるが，Besseyの提案しているThiamine 定量時の Benzenesulfonyl chloride による不活性化法において，TA の生成が速やかで完全である点よりみて BST(Ⅴ) から，そのチオール型(Ⅵ) を経て TA(Ⅱ) になる経路が起り易いものと推定した。

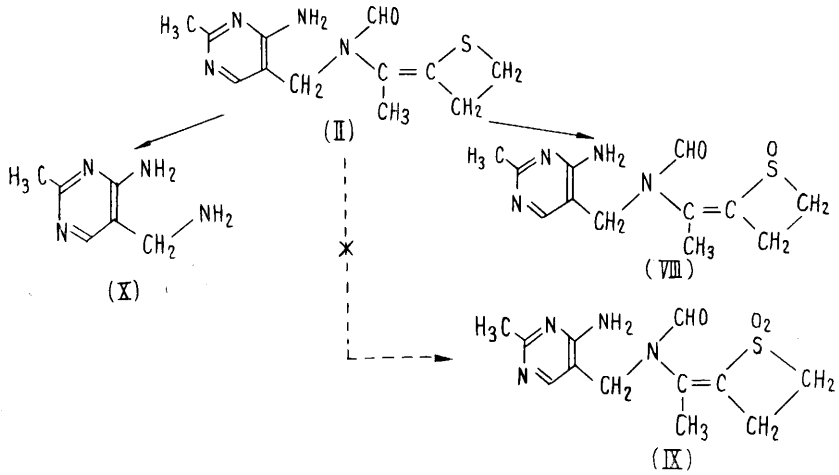


〔2〕 Benzenesulfonylthiamine の代謝と生物学的効力

Benzenesulfonylthiamine (BST) はアルカリ性で TA (Thiochrome 反応陰性) となるので，この反応を利用して，Thiamineとの分離測定法を定めた。試料中 Thiamine の量は試料の酸性液をそのまま酸化したときに生ずる蛍光度 (F) から試料をまずアルカリ性とし BST⟶TA とした後に再び酸性として Thiochrome に酸化し生ずる蛍光度を差し引いたものであり，BST 量はFから Thiamine 量を差し引いた値として求められる。

BST (Thiamine として 5 *mg* 相当量) をシロネズミに投与して，その代謝を上の定量術式に従い検討すると，経口投与で10%未満，腹腔内注射で80%以上がそのまま加水分解されずに排泄され遊離の Thiamine はほとんど検出されなかった。Thiamine HCl 投与時の尿中排泄量に比べ同じような排泄状況であるのみでなく，BST 投与尿中からTAまたその代謝産物を検出でなかった。比較のためシロネズミ体内での TA の代謝産物を追求し，尿中より Thiamine anhydride sulfoxide (Ⅷ) と2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-

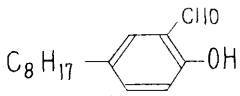
pyrimidine(Ⅹ)を結晶状に得，これらはいずれも元素分析値，紫外および赤外吸収スペクトルなどによって同定できた。Thiamine anhydride の Sulfoxide(Ⅷ) は sulfone(Ⅸ) との区別が困難なので PbO_2 酸化による酸素消費量のポーラログラフによる測定によって確認できた。以上 TA の変化は次の通りである。



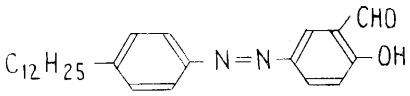
これらの成績により Thiamine, BST および TA のシロネズミ投与時の代謝に著しい差のあることが明らかになったが，BST はシロネズミ投与時に Thiamine にも TA にも変化せず BST のまま排泄される。このことはBST が Thiamine としての効力を発揮し得ないことを意味するが，幼若シロネズミに腹腔内注射で BST を投与すると Thiamine 欠乏症予防試験および治癒試験において Thiamine 活性を示さなかった。ただ経口的に 1 日 BST 100 γ を投与すると Thiamine としての活性を示し，経口投与では消化管内で BST⟶ Thiamine への反応が起る可能性がある。 Lactobacillus fermenti を用いる測定法でも BST は Thiamine の約 $\frac{1}{20}$ の活性を示した。この効果は BST の Thiamineへの加水分解によるものと考えられるが，菌体内酵素系によるものか，培地との接触による非酵素的分解か不明である。

[3] Thiamine sulfuric ester の代謝と生物学的効力

Thiamine sulfuric ester(TSE) (Ⅺ) は BrCN とアルカリで蛍光物質を生成するが，これはブタノールで抽出されない。生成物質としてThiochrome sulfuric ester(Ⅻ)を分離し，この物質がブタノールより水によく溶解することを明らかにした。Thiamine が共存するときは Thiamine の測定はブタノール層で Thiaminesulfuric ester は水層で行なうことによりほぼ分離できる。



Ⅰ



Ⅱ

この測定法を基にして TSE のシロネズミにおける代謝を検討すると，BST の場合と同じ傾向を示し，経口投与で 24 時間尿中 7 %弱，腹腔内注射で 80 %以上がそのままの形で排泄され，いずれの場合も遊離 Thiamine としての排泄はほとんど認められなかった。また幼若シロネズミを用いる Thiamine 欠乏症治癒試験において，1日 10 γ または 100～200 γ の注射で，Thiamine 活性を示さなかった。ビタミンの硫酸エ

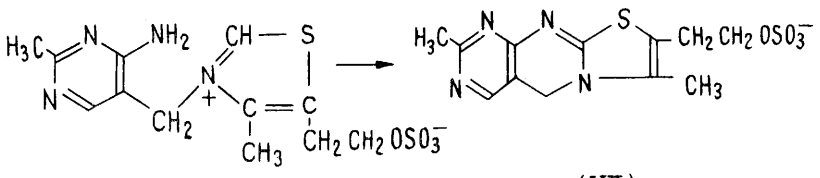
ステルはビタミンとしての効力よりは，代謝拮抗体としての意義が大きいので TSE の大量（1日 10mg）をシロネズミに注射投与するとネズミ体重は横ばいを示すが，Thiamine 10 γ の添加で体重はよく増加し，Thiamine：TSE＝1：1000の割合で拮抗現象が認められなかった。マウスにおける LD_{50} 値は約 2 mg／g でThiamineの ¼以下であり，Thiamine欠乏マウスにおいても，この値に変化がなかった。一方Thiamineを要求する微生物 Lactobacillus fermenti に対し，TSE は Thiamine との拮抗を示し 50%阻害の拮抗比は TSE：Thiamine＝1000～1 00：1 であった。阻害機構を解明するため酵母 Apocarboxylase を用いてピルビン酸の脱炭酸反応における cocarboxylase との競り合いを検討したが， cocarboxylase：TSE＝1：1000 までの範囲で拮抗を示さなかった。従って TSE と Thiamine との拮抗は cocarboxylase と TSE との拮抗ではないと考えられる。

結　　論

以上の実験により Benzenesulfonyl chloride の作用による Thiamine ⟶ TA の生成反応において中間体と考えられる BST，Benzenesulfonylthiamine disulfide の性状を明らかにし TA の生成機構としていずれも中間体と考えうるが，BST の方がより容易に TA を生成することを明らかにした。BST および Thiamine sulfuric ester のシロネズミに対する生物学的効力および代謝を検討し，いずれも腹腔内注射では動物体内で Thiamine に変化することができず Thiamine 効力を示さないが，一方 L. fermenti に対する微生物活性を検討すると BST は Thiamine の約$\frac{1}{20}$の活性を示すが，TSE は Thiamine 活性なく Thiamine と拮抗を示すことが判明した。

論文の審査結果の要旨

Benzenesulfonyl chloride の作用による Thiamine の(Ⅰ)→Thiamine-anhydride(Ⅱ)の生成反応における中間化合物として Benzenesulfonylthiamine (Ⅴ) および Benzenesulfonylthiamine-disulfide (Ⅳ) を製し両化合物から(Ⅱ) への変化を研究した。(Ⅰ)→(Ⅱ) の反応を冷却下行なうと (Ⅳ) および Thiamine disulfide(Ⅲ) が得られ少量の (Ⅱ) その他をも生成する。常温では大部分 (Ⅱ) となり，(Ⅲ) に Benzenesulfonyl chloride を作用させても (Ⅱ) を生成する。従ってこの反応は (Ⅰ)⟶(Ⅲ)⟶(Ⅳ) ⟶(Ⅱ) と進行するが，定量濃度の稀液で反応させると (Ⅱ) のみが検出された。一方(Ⅴ) は本反応の中間体として検出されなかったが，Benzenesulfonylthiothiamine (Ⅶ) より (Ⅴ) を製しアルカリ性にすると(Ⅱ) を生成し，(Ⅳ) に比べ，より容易に(Ⅱ) に変化し易い。従って(Ⅰ)⟶(Ⅴ)⟶(Ⅵ)⟶(Ⅱ) という反応経路も定量反応のような稀薄溶液では起り得ると推定される。



(XI)　　(XII)

Benzenesulfonylthiamine (Ⅴ) がアルカリ性で (Ⅱ) (Thiochrome 反応陰性) になる反応を利用して

Thiamine(I) との分別定量法を考案し，（V）のシロネズミ体内における変化を追求した。(V) は注射時（I）に変化せずそのまま尿中に排泄され，B_1 欠乏ネズミに対しB_1 活性（成長促進性）を示さなかった。経口投与では吸収が悪く尿中への排泄が少いが，僅かに加水分解されるようで 1日 100 γ（Thiamine HCl 対応量）で B_1 効力を示した。

Thiamine sulfuric ester (V′) についても Thiamine (I) との分離定量法を考案し同じくシロネズミ体内の代謝と B_1効力とを研究した。本物質は体内での加水分解が (V) に比べ困難で (V′) のまま尿中に排泄されるのみでなく，B_1 効力を認めなかった。

Thiamine 要求性の Lactcbaoillus fermenti に対する活性については(V) は Thiamine の約$\frac{1}{20}$であったが，(V′) は Thiamine に競合的に増殖阻害を行ない 50 % 増殖阻害は 1000：1 であった。(V′) はネズミまたはマウスに対し Antithiamine 効力を示さなかった。以上の実験により Thiamine のベンゼンスルホン酸エステルおよび硫酸エステルは動物体内でほとんど加水分解をうけず，そのまま排泄されること，および両化合物が Thiamine 要求性の Lactobacillus fermenti に対し異なる態度を示すことが判明した。

本研究によって Thiaminのスルホン酸エステルおよび硫酸エステルの化学的性状が明らかにされ一方において Bessey による Thiamin の定量方法の不活性化即ち Thiamine-anhydride の生成の機構を解明することができたとともに，これら化合物の生体内代謝，生物学的効力その他の研究によって Thiamine の作用機序としてチアゾール部側鎖のアルコール基が重要な意義を持つことを明白にした。

よって本論文は薬学博士の学位を授与するに十分価値あると認める。