

Title	Retinoic acidの測定ならびに代謝に関する研究
Author(s)	伊藤, 誉志男
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29748
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 2 】

氏名・(本籍)	伊 藤 蒼 志 男 い とう よ し お
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 1 5 0 2 号
学位授与の日付	昭 和 4 3 年 6 月 1 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	Retinoic acid の測定ならびに代謝に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 川崎新太郎 (副査) 教 授 青沼 繁 教 授 岩田平太郎 教 授 上原喜八郎

論 文 内 容 の 要 旨

Retinoic acid (以下 A 酸と記す) は Retinol (以下 A アルコールと記す) の末端基の $-\text{CH}_2\text{OH}$ が $-\text{COOH}$ に置きかわった物質である。

著者は A 酸の新しい定量法ならびに抽出法を考案し、これらの方法を用いて、A 酸投与後のシロネズミにおける A 酸の体内分布を経時的に測定した。また放射性 A 酸 ($-6, 7^{14}\text{C}_2$) を用いて、シロネズミにおける A 酸の排泄経路ならびに代謝物について検討し、つぎに述べる結果を得た。

I A 酸の測定に関する研究

1) 硫酸による A 酸の呈色反応

A 酸の定量法として従来 SbCl_5 反応が用いられているが、再現性に乏しく退色がはやいため、適切な方法とはいえないので、新しい定量法について検討した。

A 酸の CHCl_3 溶液に硫酸 (95%) を添加し、振とうしたところ、硫酸層が鮮赤色を呈し、その呈色は約 20 分間安定であった。この呈色反応は $540\text{m}\mu$ 以外にも $440\text{m}\mu$ に吸収極大を有し、加水によって両者の吸収極大はほぼ平行して低下していく。

A 酸の硫酸反応を SbCl_5 反応と比較したところ、両者の感度はほぼ同じで $5\sim 25\mu\text{g}$ の A 酸が定量可能であるが、再現性の点では硫酸反応の方がすぐれていた。これらのことから A 酸の硫酸反応は A 酸の定量法としての応用が考えられた。

2) 74%硫酸による A 酸の新定量法

A 酸の硫酸呈色反応は硫酸濃度によって異なり、硫酸濃度が 85% 以上では $540\text{m}\mu$ の吸光度の方が高いが、80% では $440\text{m}\mu$ の極大が $450\text{m}\mu$ に移動し、 $450\text{m}\mu$ の吸光度の方が $540\text{m}\mu$ より高くなった。硫酸濃度がさらに低下するに従い、 $540\text{m}\mu$ の吸光度はしだいに減少し、75% では消失した。 $450\text{m}\mu$ 吸光度は硫酸濃度が 74% のとき最高となった。

A酸の74%硫酸反応では2~10 μ gのA酸が定量でき、SbCl₃反応に比し約2.5倍の感度を示し、再現性の点でもまさっていた。また74%硫酸反応ではAアルコール、Aアルデヒドの呈色はA酸に比し弱く、 β -カロチン、コレステロールでは呈色がみられないことから、A酸の74%硫酸反応はSbCl₃反応、95%硫酸反応に比し特異性が高く、定量法としてもすぐれている。

3) A酸の74%硫酸呈色物の検討

A酸のCHCl₃溶液に74%硫酸を反応させ、CHCl₃層を除去したのち、3倍量の冷水を加えて、けん濁した呈色物をCHCl₃層へ再抽出し、減圧乾固した物質について調べた。本物質について Polyamide Powder による薄層クロマトグラフィー（展開溶媒 CHCl₃ またはメタノール）を行なったところ、その Rf 値はA酸と異なり、しかも単一スポットを示した。従ってA酸の74%硫酸反応物はほぼ単一物質であろうと推定される。また本物質はA酸と同様にエタノール、CHCl₃に可溶、水に不溶、アルカリに可溶であり、SbCl₃試薬で赤色を呈し、95%硫酸と反応させたときは黄色すなわち450m μ のみの吸収を示し、A酸の反応でみられた450m μ の吸収極大は現われなかった。74%硫酸と反応させたときも同じように黄色を呈した。本物質はスルホン基は検出されず、酸アルカリ移行性ならびにIRスペクトルの測定結果からカルボキシル基の存在が、IRスペクトル、NMRの測定結果から水酸基の存在が、UVスペクトル、NMRの測定結果からA酸の共役二重結合1個の消失が予想され、A酸と基本的構造においては変化していない物質であることが推定された。

A酸のSbCl₃反応物は数種の物質から成ると報告があるが、A酸の74%硫酸反応においては反応物が単一である、このことが本呈色反応のSbCl₃反応に比し呈色の再現性が高く、呈色が安定である原因のひとつと考えられる。

4) A酸の動物組織からの抽出法

従来の動物組織からのA酸の抽出法としては、組織磨砕液を直接有機溶媒で抽出後ただちに定量する方法と、さらにカラムクロマトグラフィーを行なったのちに定量する方法とがあるが、いずれもその回収率は悪い。

著者はつぎのようなA酸の抽出法を考案した。

各組織または糞尿の全量または適量（約2g）をとり9倍量の70%エタノールを加えて抽出し、沈でん物を除去後、エタノール濃度を30%にまで希釈したのち、リグロインで抽出する。分取したリグロイン層を0.1N-KOHで振とうし、アルカリ層に移行せしめ、それを酸性にして、再びリグロイン層に移行せしめ精製する。このリグロイン層について吸光度（355m μ ）をそのまま測定するか、または一定量を取り、74%硫酸反応によりA酸量を測定する。本法を用いてA酸15 μ gを添加し、腎、肺、脾、小腸、肝、血液、尿、糞での回収率を測定したところ、95~102%となり、従来の方法に比べはるかに良好な結果が得られた。

II A酸の代謝に関する研究

1) A酸の吸収部位

著者の開発した抽出法、定量法を用いて、シロネズミにおけるA酸の代謝実験を行なった。A酸3mgをシロネズミに経口投与し、糞尿中でのA酸排泄率を測定したところ、24時間までの糞から約10%のA酸が検出されたが、48時間、72時間までの糞からはもはやA酸は検出されなかった。尿につい

ては72時間まで調べたがA酸は全く検出されなかった。

そこでつぎに消化管を結紮したシロネズミについてA酸の吸収実験を行なうために、胃、小腸、大腸をそれぞれ結紮し、各部にA酸 1.2mg を注入し、各結紮部位でのA酸残存量を経時的に測定した。いずれの部位でも漸次減少したが、小腸での減少が最も著明であった。同様にして、小腸をさらに上部、中部、下部にわけて検討したところ、中部での減少が最も大きかった。

2) A酸の体内分布

結紮小腸内にA酸 1.2 mg を注入し、肝、腎、脾、肺でのA酸の経時的分布を調べたところ、いずれの臓器でも1~2時間後に最高となり、6時間後にはその大部分が消失した。2時間後の各臓器の総検出量は 69 μ g で、その70%は肝中に存在した。しかし、このときの結紮部から消失したA酸量を全て吸収量とみなすならば、各臓器でのA酸の総検出量はわずか7.7%であり、このことはA酸が動物体内で急速に代謝され、A酸特有の 355 m μ の吸収極大を示す物質または本呈色反応陽性物質が大部分分解または変化してしまったか、あるいはA酸がこれらの臓器以外の部分に分布されていることも予想されるので、つぎに放射性A酸を用いて同様の実験を行ない、広く体内各部における分布を追求した。

A酸 -6, 7¹⁴C₂ をシロネズミの結紮小腸中部内に注入し、1時間後ならびに6時間後の各組織および尿中での Radioactivity (以下 RA と記す) ならびにA酸を測定し、注入量に対する分布率を計算し、表1に示した。

〔表1〕 シロネズミの結紮小腸中部へ注入したA酸 -6, 7¹⁴C₂ 2.5mg (1.07 \times 10 cpm) の体内分布 (注入量に対する分布率)

注 入 後		1 時 間		6 時 間	
区 分		RA	A酸	RA	A酸
		%	%	%	%
A	末端組織	13.1	7.9	0.2	0
B	臓器および血液	12.9	10.4	1.5	0.8
C	消化管 (小腸上部, 胃など)	16.2	1.0	36.3	1.8
D	尿	—	—	18.5	0
E	結紮部 (小腸中部)	43.5	41.1	19.2	19.0
総 回 収 率		85.7	59.4	75.5	22.6

1時間後、6時間後のいずれのばあいも結紮部 (E) の RA と A酸の分布率がほぼ一致すること、ならびに結紮部の RA が1時間後に比し6時間後では24.5%も減少していることから、結紮部から消失したA酸は大部分吸収されたと考えられる。内部組織 (A+B) の RA は1時間後では26.0%であり、その大部分がA酸の型で存在することから、A酸はすみやかに体内各部に分布されることがわかった。しかし6時間後ではこれらの部位 (A+B) からA酸はほとんど検出されず、RA もきわめて少ないことから、6時間後ではすでにA酸代謝物としても内部組織 (A+B) にほとんど存在しないことがわかった。

3) A酸の排泄経路

表1の消化管(C)ならびに尿(D)のRAは1時間後に比し6時間後では著明に増加し、6時間後の(C+D)のRAは総回収率の73%であった。しかし尿(D)からはA酸は検出されず、消化管(C)のA酸量もきわめて少なかった。

6時間後ではA酸が大部分排泄されたとみなされるが、排泄経路としては胆管を通過して小腸上部へ出るものと、腎動脈を経て尿に出るものの二つが考えられるが、表1からみて量的には前者の方が多くことがわかる。A酸の排泄経路をさらに明らかにするため、結紮小腸中部へA酸-6,7¹⁴C₂を注入する前にあらかじめ胆管を結紮したところ、胃および小腸上部のRAは0.5%に低下し、尿中のRAが56.1%に増加した。つぎに胆管のかわりに腎動脈を結紮したところ、尿排泄量は0となり、小腸上部および胃でのRAが50.0%に増加した。

これらの結果から、A酸の排泄には腎を経て尿に至るものと、胆管を経て小腸上部から糞中に至るものの二つの経路があり、一方を遮断しても体内貯留性は高まらず、その分だけ他からの排泄量が増加することが明らかとなった。

4) A酸の代謝排泄物質

A酸-6,7¹⁴C₂を結紮小腸中部へ注入し、6時間後の小腸上部ならびに尿を採取し、この小腸上部の磨砕液ならびに尿について Radioautography をおこなったところ、両者ともそれぞれ4つの物質にわかれた。同様の操作で得た小腸上部磨砕液ならびに尿のリグロイン抽出を行ない、水層およびリグロイン移行物のRAを測定したところ、それぞれ94.6%、99.6%が水溶性区分から検出され、小腸上部の脂溶性区分からは4.8%のRAが検出され、中性脂質区分1.9%、酸性脂質区分2.4%となった。小腸上部の中性脂質区分ならびに酸性脂質区分物質はともに355m μ に吸収極大があり、74%硫酸反応を呈した。中性脂質区分物質はアルカリ加水分解すると酸性脂質区分に移行する。したがって前者はA酸エステルであり、後者は遊離A酸であることが証明された。これらは Silicagel G による薄層クロマトグラフィーでも確認され、A酸エステルはコレステロールの呈色反応を示し、加水分解したものでは二つのスポットがみられ、標準コレステロールおよび標準A酸 Rf の値とそれぞれ一致することからこのエステルはA酸のコレステロールエステルであろうと推定された。

5) A酸の無機塩による酸化分解

A酸は Krebs-Ringer 重炭酸液、Locke 液および Tyrode 液など Ca イオンおよび重炭酸イオンを含む生理液中で非常に不安定であることがわかった。このようなA酸の減少は Ca イオンの代りに Mg, Ba, Cu を用いたときでもみられ、嫌氣的条件下あるいは抗酸化剤の添加により抑制されることから、本反応はA酸の金属イオン存在下における酸化分解であることが明らかになった。またこのような現象はAアルデヒド、Aアルコールではみとめられなかった。A酸ならびにAアルコールの各酸化剤にたいする態度はほとんど変わらず、各酸化剤により同じように酸化分解された。空気酸化においてはAアルコールの方がA酸より酸化されやすい。それにもかかわらず Ca イオンその他の存在においてA酸のみが容易に分解された。したがってA酸が動物体内で非常に急速に代謝分解されるのは酵素分解のみによるのではなく、生体内に存在する金属イオンが触媒的に作用してA酸を分解することも考えられる。

〔結 論〕

(1) 硫酸によるA酸の呈色反応を検討し、74%硫酸によるA酸の呈色が従来の SbCl_3 法に比し感度も高く、呈色物の持続性、安定性、再現性の点でもまさっていることを明らかにし、これを用いてA酸の新定量法を考案した。

(2) A酸の74%硫酸反応物はほぼ単一物質であることを証明し、このことがA酸の74%硫酸呈色が SbCl_3 呈色に比し、呈色の再現性が高く、呈色が安定である原因のひとつと考えられる。

(3) 動物組織その他からのA酸の抽出法を検討し、溶媒抽出、アルカリ層への移行を組み合わせ、回収率の高い新抽出法を考案した。

(4) A酸の吸収実験を行なうために、シロネズミを用い、その消化管を結紮し、結紮部にA酸を注入し、結紮部のA酸残存量を経時的に測定した。

小腸を結紮したシロネズミにおいては、胃、大腸を結紮したものに比べ残存量がはるかに低い。また小腸を上、中、下の3部にわけて結紮したときには、中部の残存量が最も低かった。したがってA酸は小腸中部において最もよく吸収されるものと考えられる。

(5) A酸 $-6,7^{14}\text{C}_2$ をシロネズミの結紮小腸中部へ注入し、1時間後、6時間後の各組織ならびに尿中での Radioactivity ならびにA酸量を測定した。1時間後、肝、腎、血液のほか毛皮、真皮、筋肉、骨などの末端組織に Radioactivity が検出され、その大部分がA酸の型で存在した。しかし6時間後ではこれらの組織からはA酸のみならず Radioactivity もほとんど検出できなくなった。

排泄経路としては胆管を経て小腸上部へ至るものと、腎から尿に至る二つがあり、量的には前者の方が多。なおこれらの排泄経路は胆管ならびに腎動脈結紮実験によって一層明らかになった。これらの経路における代謝物を追求したところ、その大部分は水溶性物質になっており、A酸は小腸上部にきわめて少量が検出されたにすぎない。そしてその一部はコレステロールエステルになっていることが推定された。これらの成績からみて、A酸を投与したばあい、すみやかに代謝されてA酸以外の物質に変化し、胆管および腎を通してそれぞれ消化管および尿へ排泄されることが明らかになった。

(6) A酸は Tyrode 液、Locke 液または Krebs Ringer 重炭酸液などの生理液で放置するだけで著明な減少がみられ、これは Ca イオンと重炭酸イオンの組合せによることを証明した。この分解は抗酸化剤添加および嫌気的条件下ではみられないことから、酸化分解であることが明らかとなった。 Ca 以外に Mg , Ba , Cu イオンなどでも同様な現象がみられる。これらの現象はAアルコールおよびAアルデヒドではほとんどみられないA酸の特異的な分解反応であってこれが体内におけるA酸の代謝が迅速である原因のひとつであろうと推定される。

論文の審査結果の要旨

Retinoic acid は動物体内でビタミンAアルデヒド (Retinol) の酸化により生成の予想される化合物であるので、その正確な測定法として74%硫酸による、呈色反応を研究し、従来の SbCl_3 法に比べ信頼性の高い方法を案出し、生物体の Retinoic acid の抽出定量法として実用化した。シロネズミの

結紮腸管中に 6,7-¹⁴C₂-Retinoic acid を投与したが、急速に末端組織まで分布されついで消失した。胆管を経て小腸上部と腎から尿に排泄され、その部分は Retinoic acid の分解物であって、少量の Retinoic acid が小腸上部から回収された。以上の研究成績により Retinoic acid の代謝を明らかにし新知見を得たので本論文は薬学博士を授与するに価値あるものと認める。