



Title	ウシ脳脂質中の降圧因子の研究
Author(s)	山田, 貞二
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33136
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)	やま だ まだ じ 山 田 貞 二
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 4 0 9 号
学位授与の日付	昭 和 56 年 8 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	ウシ脳脂質中の降圧因子の研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岩田平太郎 (副査) 教 授 近藤 雅臣 教 授 鎌田 皎 教 授 青沼 繁

論 文 内 容 の 要 旨

序 論

生体内に存在する薬理活性リン脂質としては, lysophosphatidylethanolamine, lysophosphatidic acid等が知られている。¹⁻³⁾

Martini, Chiesa等は種々の動物の神経組織のacetone抽出物中に血圧作用をはじめ, 多くの生理活性を有する物質が存在すると報告した。⁴⁻⁶⁾ しかしこれらの結論は総て crudeな抽出物を用いて得られたものであり信頼し難い。

申請者はウシ脳acetone抽出物中に強力な降圧作用を呈する物質を見出し, 種々の方法で精製してTLC的に単一な標品を得た。⁷⁾ この活性物質を仮にDepressor-I (D-I) と命名したが, その化学構造を推定するために, 薬理学的性質及び化学的性質の検討を行ない, 又各種機器により分析を行なった。⁸⁻¹⁰⁾

本 論

〔1〕 D-I の調製

D-Iの調製法をchart 1に示した。新鮮なウシ全脳を細切後, Folchの抽出法により総脂質を得た。この総脂質を数種類の有機溶媒による分別法を施し, 粗抽出物を得た。これをsilicic acid chromatography並びにSephadex LH-20によるgel濾過により精製した。各々の精製段階における濃縮効率をTable 1に示した。

(2) D-Iの化学的性質

D-Iは非極性溶媒には不溶であるが, 水, EtOH, CHCl₃等には可溶である。熱に対してD-Iは37°,

aqueous ethanol extract III
 | chromatographed on the first silicic acid column
 active fraction IV (CHCl₃-MeOH (4: 6, v/v))
 | chromatographed on the second silicic acid column
 active fraction V (CHCl₃-MeOH (5: 5, v/v))
 | filtered on the first Sephadex LH-20 column with CHCl₃-MeOH (1: 1, v/v)
 active fraction VI
 | filtered on the second Sephadex LH-20 column with acetone-EtOH (1: 1, v/v)
 active fraction VII

Chart 1. Modified Procedure for Purification of the Hypotensive Factor D-I

TABLE 1. Purification procedure of the hypotensive factor D-I

Stage	Weight (mg/kg wet tissue)	Phosphorus (μ g/kg wet tissue)	Hypotensive activity (U/kg wet tissue)*
Crude extract (aq. EtOH extract) III	1.2×10^3	11.34×10^3	—
First silicic acid chromatography IV	71.3	835	630
Second silicic acid chromatography V	11.0	576	610
First gel filtration on Sephadex LH-20 (CHCl ₃ -MeOH, 1:1 v/v) VI	9.4	482	600
Second gel filtration on Sephadex LH-20 (acetone-EtOH, 1:1 v/v) VII	5.3	271	540

Data are the mean of two experiments. Bioassays were carried out on urethane anaesthetized rats. *One unit(U) of D-I activity was defined as the amount required to produce a depressor response equal in amplitude to that produced by i.v. administration of 5×10^{-8} g/kg of acetylcholine into an urethane anaesthetized rat weighing 250 g.

24時間のincubationにより、その活性の約80%は回収できたが、100°、8時間では完全に失活し熱に対して不安定な傾向を示した。又pHに対してD-IはpH1.0、37°、8時間のincubationにより約50%、pH12.0では約20%の活性は回収されたが、pH13.0では全く失活し、酸性側に比べ塩基性側で不安定な傾向を示した。保存状態による安定性の吟味では窒素で置換して-20°でsyrup状に保存すれば約4ヶ月間降圧活性を維持できる。(Fig. 1)

非極性有機溶媒と水との分配では、降圧活性はほとんど水層に存在したが、極性溶媒と水との分配では逆にほとんどの活性は有機溶媒層に認められた。一方総ての分配において、水層のpHの影響は認められなかった。(Fig. 2) TLCでD-Iは中性、酸性、塩基性何れの溶媒系でも、単一のspotを与えた。又他の既知の脂質類とそのRf値を比較すると、検討したどの溶媒系においても, lysolecithin (LPC) のRf値に極めて近い値を示した。80% EtOHを溶出溶媒にした Sephadex LH-20でのgel 濾過による分子量測定では、D-Iは500—700の分子量を有すると判断された。(Fig. 3)

(3) D-Iの機器による分析

比旋光度は $[\alpha]_D = 3.3$ (CHCl₃) であった。紫外吸収は200nm, 225nm付近にみられた。IR spectrumはLPCのspectrumに極めて似ていた。(Fig. 4) NMRでは積分値並びにproton signalはLPCの構造を暗示した。(Fig. 5) 推定される構成成分の定量結果は有機リンに対する脂肪酸, gly-

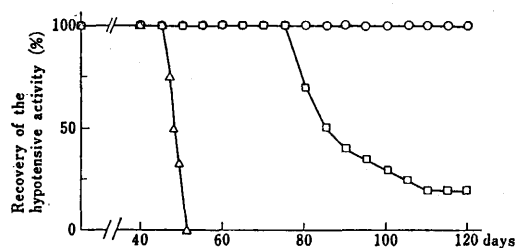


Fig. 1. Stability on Standing of the Hypotensive Factor D-I

△-△: in NaCl solution, at 4°.
□-□: in CHCl₃-MeOH (2: 1, v/v), at 4°.
○-○: as a syrup form, at -20°.

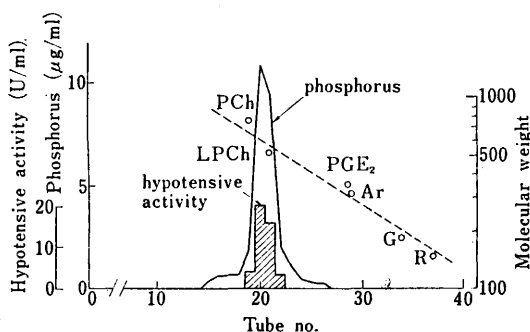


Fig. 3. Elutional Profile of the Hypotensive Factor D-I on Sephadex LH-20 Column Eluting with 80% Ethanol

Column: Sephadex LH-20 100 g (Pharmacia), 2.7 × 90 cm).
One tube: 10 ml.

Sample: D-I preparation VII 4.77 mg corresponding to 900 g of bovine brain.

PCh: L-Dipalmitoylphosphatidyl choline (M.W. 751)

LPCh: L-1-Palmitoyllysophosphatidyl choline (M.W. 514)

PGE₂: Prostaglandin E₂ (M.W. 352)

Ar: Arachidic acid (M.W. 313)

G: D-Glucose (M.W. 183)

R: D-Ribose (M.W. 150).

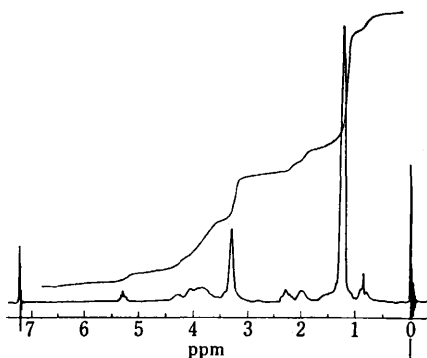


Fig. 5. NMR Spectrum of the Hypotensive Factor D-I

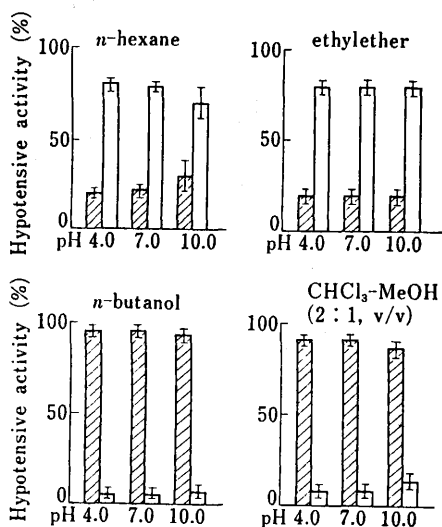


Fig. 2. Partition Behaviours of the Hypotensive Factor D-I

▨: organic layer □: aqueous layer
The data were shown as means ± standard errors of the means. *n* = 5.

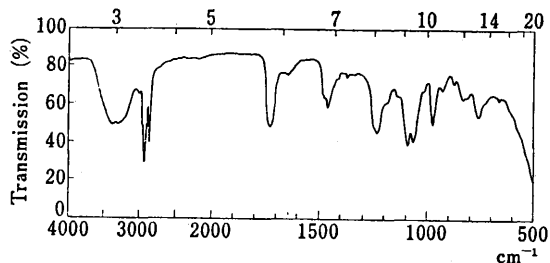


Fig. 4. IR Spectrum of the Hypotensive Factor D-I (Liquid Film)

TABLE 2. Fatty Acid Composition of the Hypotensive Factor D-I

Fatty acid	%
C _{14:0}	trace
C _{15:0}	trace
C _{16:0}	26.6
C _{16:1}	1.2
C _{17:0}	0.2
C _{17:1}	0.2
C _{18:0}	6.4
C _{18:1}	56.1
C _{18:2}	0.4
C _{19:1}	0.4
C _{20:1}	8.5

Fatty acid methyl esters obtained by methanolysis of D-I preparation VII were analyzed by a Shimadzu Gas Chromatograph GC-5A equipped with a glass column (3 mm id × 1.5 m) packed with 15% DEGS on 60-80 mesh Gaschrom Q; column temp. 160°, injection temp. 210°, nitrogen flow rate 25 ml/min.

cerol, cholineのモル比は総て約1:1であった。又脂肪酸構成は $C_{18:1}$, 56.1%, $C_{18:0}$ 26.6%, $C_{20:1}$ 8.5%であり, 不飽和脂肪酸を多く含んでいた。(Table 2) 一方脂肪酸以外に二, 三の微量成分を確認した。その一つはGC-MASS分析により Cholesterolと判明した。

(4) D-Iの全身血圧に及ぼす効果

ラットに対するD-Iの降圧作用は用量依存적であった。threshold doseは 1.5×10^{-5} g/kgであり, tachyphylaxis並びにsensitizationは観察されなかった。(Fig. 6) ラット以外の実験動物(ネコ, イヌ, モルモット, ウサギ)に対しても, D-Iは降圧作用を示した。44/kgの静注により感受性を比較した結果, イヌはやや低いようであるがその他の動物はラットと同程度の感受性であった。(Table 3) D-Iは無麻酔無拘束ラットに対しても降圧作用を示したが, 麻酔下と同程度の作用を発現させるには相当多量のD-Iを必要とした。D-Iの降圧作用に及ぼす麻酔薬の影響を検討した結果pentobarbital麻酔下に最も強くその作用は発揮された。

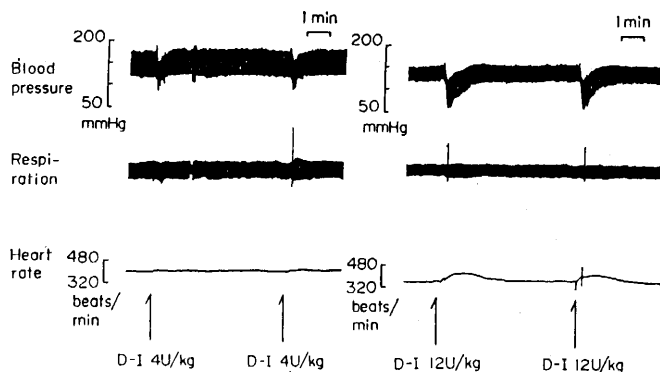


FIG. 6. Simultaneous recordings of the effect of D-I on the systemic arterial blood pressure, the respiration and the heart rate. The rat was anaesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, *i.p.*) and given *i.v.* 4 U/kg (39.2×10^{-6} g/kg) and 12 U/kg (117.6×10^{-6} g/kg) of purified D-I preparation at the points indicated by arrows. The blood pressure, respiration and heart were recorded on a multi-purpose polygraph.

TABLE 3. Effects of D-I on the blood pressures of various species

Species	Effect	mmHg
Rat	Hypotensive	25 ± 3
Cat	Hypotensive	23 ± 3
Dog	Hypotensive	18 ± 4
Rabbit	Hypotensive	27 ± 3
Guinea pig	Hypotensive	27 ± 3

Sodium pentobarbital (40 mg/kg, *i.p.*) was given. Purified D-I preparation 4 U/kg (39.2×10^{-6} g/kg) was also given *i.v.* The results are the means \pm s.e. (n=3).

(5) D-Iの降圧作用の機序

D-Iの降圧作用はspinal ratでも観察された。reserpineはD-Iの降圧作用には何ら影響を与えなかった。hexamethonium, propranolol, atropine並びにdiphenhydramineの前処理においても, D-

Iは拮抗薬投与前と同程度の降圧を示した。(Fig. 7) ウサギ耳介血管灌流では、灌流滴数が用量依存的に増加した。モルモット回腸に対して、D-Iは刺激作用を持たなかった。しかし histamine hist) や acetylcholine (ACh) による刺激作用に対して抑制効果を示した。

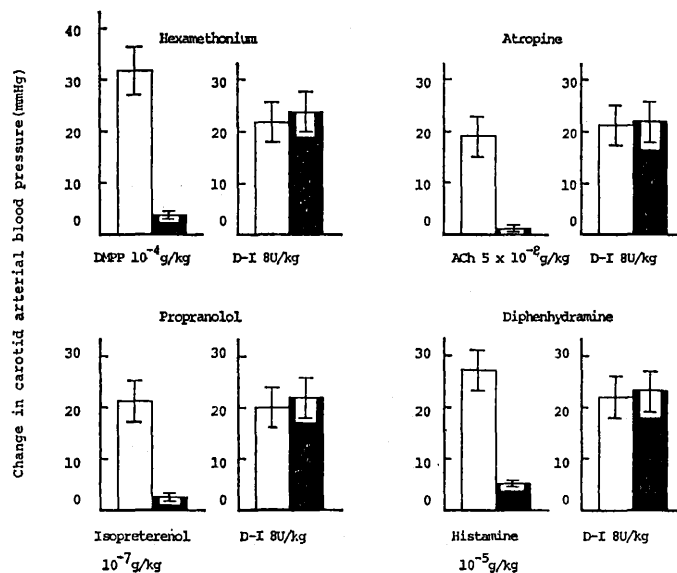


FIG. 7. Effects of four antagonists on hypotensive activity of D-I in urethane anaesthetized rats. The effect of each antagonist was confirmed by *i.v.* administration of the corresponding agonist, before and after injections of 8 U/kg (78.4×10^{-6} g/kg, *i.v.*) of purified D-I preparation. Results represent the means \pm s.e. ($n=3$). ordinate: change in carotid arterial blood pressure in mmHg. White column represents blood pressure response before administration of respective antagonist. Black column represents blood pressure response after administration of the respective antagonist. Doses of respective antagonists were as follows: hexamethonium bromide 3 mg/kg, *i.v.*, atropine 2 mg/kg, *i.v.*, propranolol 1 mg/kg, *i.v.* and diphenhydramine 7 mg/kg, *i.v.*

即ち D-I は hist, ACh による回腸の収縮を非競合的に抑制した。D-I の降圧機序として末梢神経系又は hist 等の受容体を介して、その作用を発現しているとは考え難い。一方ウサギ耳介血管、モルモット回腸における D-I の挙動より末梢血管に対する直接作用が推定されるが本作用を主要因と考えるには用量の点から無理がある。

(6) D-I の血小板に対する作用

D-I は heparin 処理したネコ血小板を *in vitro* で凝集させた。250 mU/ml では一次凝集が観察され、500 mU/ml では二次凝集も顕著に観察された。この結果より D-I の降圧作用に血小板凝集が大きな役割をはたしていると考えられる。

(7) LPC の薬理学的作用

D-I の分析の結果は LPC に近似していたが D-I の薬理学的作用が LPC の脂肪酸分子種により説明可能か否か知るために、種々の脂肪酸を有する L- α -LPC 分子種の薬理学的作用を検討した。

ラットに対して C_{10} — C_{18} の飽和脂肪酸を持つ合成 L- α -LPC 類は総て降圧作用を示した。L- α -

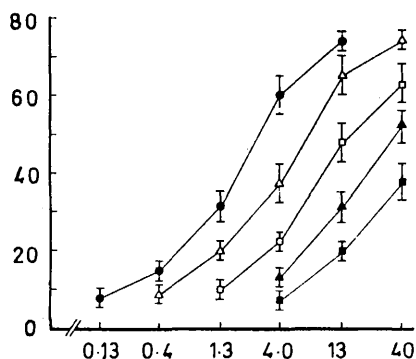


Fig. 8. Dose-response relation of saturated LPCs. The fatty acid composition of the LPCs is indicated by: ■ C_{10:0}, □ C_{12:0}, ● C_{14:0}, △ C_{16:0}, ▲ C_{18:0}. Results are expressed as means ± s.e.m. Ordinate: Decrease in carotid arterial blood pressure (mm Hg). Abscissa: Intravenous lysophosphatidyl choline (μmol kg⁻¹).

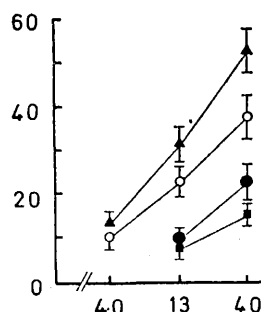


Fig. 9 Dose-response relation of unsaturated LPC(C₁₈)s. The fatty acid composition of the LPCs is indicated by: ▲ C_{18:0}, ○ C_{18:1}, ● C_{18:2}, ■ C_{18:3}. Results are expressed as means ± s.e.m. Ordinate and abscissa as for Fig. 8

myristoyl-LPCが最も強力な降圧作用を示したが、これより炭素数が増減してもその作用は低下した。(Fig. 8) 炭素数18の不飽和脂肪酸を持つL-α-LPC類も同様に降圧作用を示したが、その中ではL-α-oleoyl-LPCが最も強力な作用を示し、二重結合の導入は降圧作用を低下させた¹⁾ (Fig. 9) ネコ、モルモット、ウサギに対しても、合成L-α-LPC類は降圧作用を示した。ウサギ耳介血管灌流に対して、総ての合成L-α-LPC類は滴数を増加させた。L-α-palmitoyl-LPCが最も滴数増加作用は強く、炭素数並びに不飽和度による効果は血圧作用の場合に似ていた。L-α-palmitoyl-LPCはモルモット回腸に対して、hist, AChによる収縮を抑制した。又この抑制作用は非競合的であった。そこでpD₂を指標にして合成L-α-LPC類の抑制作用を比較した。hist, AChの何れの刺激薬の場合にも、L-α-palmitoyl-LPCが最も抑制作用は強く、炭素数並びに不飽和結合導入の効果は血圧作用等の場合と似ていた。

検討したL-α-LPC類の薬理学的挙動はD-Iのそれと全く一致していた。一方用量に関してはD-Iのウサギ耳介血管並びにモルモット回腸に及ぼす作用はD-Iの脂肪酸組成とparallelな合成L-α-LPC類の用量範囲内で十分説明された。しかし降圧作用についてはL-α-LPC類では説明できなかった。更に降圧活性以外にもD-IとLPCの間には血小板に対する作用に差がみられた。

(8) イヌ腹腔透析液中の類似活性物質について^{1) 13)}

イヌ腹腔透析液中にD-Iと類似の降圧活性物質を確認し、本物質の精製、単離、分析並びに薬理学的性質等について検討した。

結 論

D-Iは中性ないし両性の性質を有する相当極性の高い化合物でありその分子量は500—700の範囲と推定された。

TLC, 機器分析の結果はLPCに極めて近似した化合物と推定された。しかし合成L-α-LPC類を用いて検討した結果、D-Iの降圧活性の強さをL-α-LPCとしては説明できなかった。

他方血小板に対する作用を検討した結果、D-Iは血小板を顕著に凝集させたので、この作用がD-I

の降圧作用の主たる要因と考えられる。このようにD-IとLPCの間には降圧活性、血小板凝集作用に顕著な差がみられることから、D-Iを通常のLPCの一種とは考え難く、LPC以外の化合物を考慮する必要がある。D-Iが一般的なLPCと化学的に近似した挙動を示したことを考慮してD-Iの化学構造を一般的なLPCの脂肪酸側鎖の代りに未知物質が何らかの結合様式を介してglycerolに結びついたlyso型choline含有glycerophospholipid又はその近似化合物と推定した。

References

- 1) J. G. Turcotte, R. E. Boyd, J. G. Quinn and R. R. Smeby, *J. Med. Chem.* **16**, 166 (1973)
- 2) R. D. Bunag, E. J. Walaszek, *Eur. J. Pharmacol.* **23**, 191 (1973)
- 3) A. Tokumura, K. Fukuzawa and H. Tsukatani, *Lipids*, **13**, 572 (1978)
- 4) E. Martini, A. Marzoreti and E. Morpurgo, *Experientia*, **8**, 225 (1952)
- 5) F. Chiesa, *Ist. Lombardo (Rend. Sc.)* **93**, 7 (1959)
- 6) F. Chiesa, *ibid.* **93**, 26 (1956)
- 7) H. Tsukataki, S. Yamada, A. Tokumura, T. Miyamoto and K. Takauchi, *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 2294 (1976)
- 8) H. Tsukatani, S. Yamada, M. Fujii, T. Awaji, M. Okamoto and T. Itami, *ibid.* **26**, 3271 (1978)
- 9) H. Tsukatani, S. Yamada, K. Takauchi, A. Tokumura, H. Tatsumichi and K. Kumegawa, *ibid.* **26**, 3281 (1978)
- 10) H. Tsukatani, S. Yamada, A. Tokumura and T. Itami, *Jpn. J. Pharmacol.* **29**, 695 (1979)
- 11) H. Tsukatani, S. Yamada, K. Fukuzawa and C. Hamaguchi, *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 110 (1979).
- 12) H. Tsukatani, S. Yamada, A. Tokumura, T. Itami and K. Takauchi, *J. Pharmaceuticall Sci.* **68**, 1426 (1979)
- 13) H. Tsukatani, S. Yamada, A. Tokumura, K. Takauchi and T. Itami, *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 569 (1979)

論文の審査結果の要旨

本論文はウシ脳のアセトン抽出物中に存在する降圧作用物質の精製を試み、その薬理学的性質および化学的性質の検討、ならびに各種の機器分析を行なったもので、薬学博士の称号を授与するにふさわしいものであると考える。