

Thiamine Tetrahydrofurfuryldisulfide のビタミン B₁ 効果に関する研究

(Ⅲ) 肝臓磨砕液によるビタミン B₁ への還元

岡山大学医学部小児科教室 (指導: 浜本英次教授)

三 宅 健 二

[昭和34年8月21日受稿]

Alkyldisulfide 型 B₁ 誘導体である Thiamine alkyldisulfide (TAD), Thiamine propyldisulfide (TPD) 等は動物組織, 血液によつて容易に B₁ に還元されることが知られている。即ち藤原等¹⁾は TAD が肝切片により B₁ に還元されることを認め鈴置²⁾, 松川³⁾, 内野⁴⁾ 南条⁵⁾ は TAD のみならず TPD も血液, 組織ホモチネート等により還元されると報告し, 又この還元因子は酵素的因子と耐熱性因子の両成分よりなることが報ぜられている。ついで玉置はシロネズミの各臓器中の TAD 還元因子を耐熱性因子と易熱性因子の 2 つに分けてそれ等の分布を明らかにした。之によると投与された Alkyldisulfide 型 B₁ は組織親和性に関してはともかく体内で速かに B₁ に還元された後 B₁ 効果を現わすものであるとされている。

著者は新しく合成された Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide (TTFD) のシロネズミ肝組織による B₁ への還元速度を測定すると共に従来の Alkyldisulfide 型 B₁ である Thiamine oxyethyl disulfide (TOED), TPD に対する夫と比較検討し TTFD か TAD, TPD, TOED と同様に容易に B₁ に還元されるかどうか, 或はこの還元度と前報におけるジウシマツの B₁ 欠乏予防効果との間に関連が認められるかどうかを検した。

(1) 実験方法

体重 50 g 前後のシロネズミを 2 週間一定の普通食餌をもつて飼育した後致死せしめ直ちに肝臓をとり出し, その 1 g に等張塩水カリ溶液 (0.154M の KCl と 0.04MKHCO₃) 8cc を混じり溜水で 1000cc としたものを 4 cc 加えてホモチナイズするとこれによつて 5 倍の肝ホモチネート稀釈液となり, 又肝臓 1 g に対して 49

cc の等張塩化カリ溶液を加えてホモチネートすれば 50 倍稀釈の肝ホモチネートができる。本実験ではこの 5 倍稀釈と 50 倍稀釈の肝ホモチネートを用いた。上記一定稀釈の肝ホモチネートを 37°C 水浴中 15 分間時々攪拌しながら浸出し, 後 3000r.p.m. 15 分間遠心沈澱すれば乳白色の上清がえられる。この上清を各稀釈倍率によつて, 5 倍稀釈の肝浸出上清, 50 倍稀釈の肝浸出上清と呼ぶこととする。

次に 4 本の容積 50cc の試験管を用意 (第 1 表に示す様に各溶液を混合する。

第 1 表

試験管番号	1	2	3	4
浸 出 上 清	2 cc	2 cc	2 cc	2 cc
1/10 M 磷酸緩衝液 (PH.7.0)	10cc	10cc	10cc	10cc
T O E D 液	—	2 cc	—	—
T P D 液	—	—	2 cc	—
T T F D 液	—	—	—	2 cc
水	8 cc	6 cc	6 cc	6 cc

各 B₁ 誘導体液は B₁ 20γ/cc と当モル相当濃度である。

試験管(1)には 5 倍或は 50 倍稀釈肝浸出上清 2 cc, 1/10 M 磷酸緩衝液 100cc, 蒸溜水 8 cc を混合する。これは肝浸出上清中に含まれる B₁ 量を測定するための対照実験である。試験管(2), (3), (4)には 5 倍或は 50 倍稀釈肝浸出上清 2 cc 宛, 1/10 M 磷酸緩衝液 100cc 宛, ついで各々 TOED, TPD, TTFD, の 20γ/cc 水溶液 (この γ は B₁ 20 γ と当モル相当量である) を 2 cc 宛最後に蒸溜水 6 cc 宛加える。従つて試験管(2)(3)(4)には各 B₁ 誘導体が B₁ に換算して 40 γ 宛含まれていることになる。

試験管(1)(2)(3)(4)共に混和液の総量は200ccとなる。それ故に肝浸出上清の最終稀釈濃度は5倍稀釈浸出上清を用いたときは最終稀釈濃度は50倍となり、50倍稀釈浸出上清を用いたときは最終稀釈濃度は500倍となる。

かくして反応準備が終了したのち各試験管を同時に37°Cの水浴中に保つて反応を開始させた。その後直後10分、20分、30分後に各試験管より2cc宛反応液をとり直ちに10%メタ磷酸5cc、蒸溜水18ccの混液中に加えて攪拌し、15分間静置後濾過し、濾液20ccを $\frac{1}{10}$ N苛性ソーダでpH4.5に修正しパームチットに吸着し以後方式に従い藤田氏チオクローム法によつて遊離 B_1 量を測定した。螢光測定にはコールマン分光光度計附属の螢光光度計を使用した。尚反応によつて B_1 誘導体から遊離した B_1 量は次の如くして算出した。即ち試験管(1)で測定される B_1 量は反応液20cc中に含まれる B_1 絶対量 γ であり、試験管(2)(3)(4)の夫は各 B_1 誘導体が還元されて遊離した B_1 絶対量 γ である。従つて、試験管(2)(3)(4)から試験管(1)の B_1 量を引けば、 B_1 誘導体40 γ から還元されて生じた遊離 B_1 量が計算出来る。尚報で記載される各 B_1 誘導体の γ 数はいずれも B_1 と当モル量として示しておいた。実験方法は以上の如くであるが還元反応の条件が複雑であるために詳しいことは実験結果において述べることにした。

(2) 実験結果

A) 最終稀釈濃度50倍の肝浸出上清による各 B_1 誘導体の B_1 への還元実験

先ず実験方法のところ述べてようにして作った5倍稀釈の肝浸出上清を使用し最終稀釈濃度50倍の肝浸出上清によるTOED, TPD, TTFDの B_1 への還元実験を行った。即ち試験管(1)には5倍稀釈の肝浸出上清2cc、 $\frac{1}{10}$ M磷酸緩衝液(pH7.0)10cc、蒸溜水8ccを混じて対照実験とし、試験管(2)(3)(4)には5倍稀釈の肝浸出上清2cc宛、 $\frac{1}{10}$ M磷酸緩衝液10cc宛及び各々TOED, TPD, TTFDの20 γ /cc溶液2cc宛、更に蒸溜水6cc宛を加えて主実験とした。この場合各管共に肝浸出上清が一番最後に加えた。

肝浸出上清を加えた直後に先ず B_1 量を測定し反応直後の値とした詳しくは後の実験でわかる様に肝浸出上清を加えた時の管内溶液の温度が高いと反応時間直後でもかなり還元反応がすすむ。この実験では肝浸出上清を加えた時の温度は20°Cとした。次に各管を37°Cの水浴中に保ち60分後に再び反応液中の B_1 量を測定した。その結果は第2表の如くである、即ち各 B_1 誘導体40 γ から遊離した B_1 絶対量(γ)をもつて還元

第2表 最終稀釈濃度50倍の白鼠肝浸出上清によるTPD, TOED, TTFDの B_1 への還元

反応時間 (反応温度)	添加 B_1 誘導体	TPD (40 γ) 添加	TOED (40 γ) 添加	TTFD (40 γ) 添加
直後 (20°C)		39.93 γ (99.8%)	30.68 γ (76.7%)	31.99 γ (80.0%)
60' (37°C)		33.83 γ (84.5%)	31.67 γ (79.2%)	33.51 γ (83.8%)

各 B_1 誘導体の添加量は B_1 40 γ 相当量であり、数字はここから還元によつて遊離した B_1 絶対量(γ)を示す。括弧内は各 B_1 誘導体の添加量に対する還元率を示す。第3, 4表も同様である。

* この γ 数はPPD中の B_1 相当部分の量を示している。

状態をあらわした、括弧内は添加した各 B_1 誘導体の B_1 還元百分率と仮称する。直後の値が既にTPDでは39.93 γ 、 B_1 に還元されている事である。即ち還元率99.8%であつた。反応時間が60分の場合には却つて低下し33.83 γ が B_1 に還元され還元率は84.5%となつた。この理由は恐らく一たび遊離した B_1 の一部が酸化されてThiothiamineとなつたか或はその他の形に分解されたためと考えられる。TOEDは混合直後で30.68 γ が B_1 に還元された。即ち還元率は76.7%であつた。反応後60分目には31.67 γ が B_1 に還元され79.2%の還元率を示した。又、TTFDは直後で31.99 γ が B_1 に還元された。即ち還元率は80%で反応時間60分では33.51 γ が B_1 に還元され83.8%の還元率を示した。この結果は次の実験においてもわかる様に還元が反応時間瞬間から60分まで殆んど進まなかつたのではなく、恐らく反応時間が60分経過する途中において一度殆んど全量が B_1 に還元されたのち、この B_1 が酸化分解をうけて B_1 の収量が減少しあたかも反応がすすまなかつた様に見えるものであると考えられる。本実験で注目されるべきことは瞬間の反応において各 B_1 誘導体いずれも可成り強く B_1 に還元されていることであつて特にTPDは最も速かであることについてTTFD, TOEDの順となることが明らかとなつた。しかし、この実験では肝浸出上清の濃度が高いためと20°Cにおいて肝浸出上清を B_1 誘導体添加液に加えたためこの様に還元反応が早くなつたのでかかる状態では、還元速度を十分に比較することが出来なかつた。そこで次の肝浸出上清を更に稀釈して50倍稀釈浸出液とし更に肝浸出上清を各 B_1 誘導体添加液に加えるときの温度を低くして行つた。

B) 最終濃度500倍の肝浸出上清による各B₁誘導体のB₁への還元実験

実験方法の部にて述べた如くして作った50倍稀釈の肝浸出上清を使用し最終稀釈濃度500倍の肝浸出上清による TPD, TOED, TTFD のB₁への還元実験を行った。即ち、予め試験管(1)には 1/10M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 10cc, 蒸留水 8 cc を加え試験管(2)(3)(4)には 1/10M 磷酸緩衝液 10cc 宛各 TOED, TPD, TTFD の 20γ/cc 水溶液 2 cc 宛及び蒸留水 6 cc を加える。管(1)は対照実験、管(2)(3)(4)は主実験用である。次は各管を10°C 又は0°C の水浴中に保ち、別に50倍稀釈の肝浸出上清を作り、これも10°C 又は0°C の水浴中に入れておく。ついで冷却された肝浸出上清を各管に 2 cc 宛加えると同時にB₁測定を行う。これを反応後の値とし、ついで各管を今度は37°C 水浴中に保ち、以後10分毎30分間B₁測定を行った。

(1)肝浸出上清を各管に加えたときの管内溶液の温度が10°C であつた場合の実験結果は第3表に示した。表示方法は前の実験の場合と同じである。

第3表 最終稀釈濃度500倍の白鼠肝浸出上清による TPD, TOED, TTFD のB₁への還元

反応時間 (反応温度)	添加B ₁ 誘導体	TPD	TOED	TTFD
		(40γ) 添加	(40γ) 添加	(40γ) 添加
0' (10°C)		20.75γ (51.9%)	3.24γ (8.1%)	11.21γ (28.0%)
10' (37°C)		40.01γ (100%)	19.89γ (49.7%)	30.37γ (75.9%)
20' (37°C)		38.22γ (95.6%)	27.59γ (69.0%)	38.8γ (97.2%)
30' (37°C)		35.15γ (87.9%)	36.48γ (91.2%)	39.82γ (99.6%)

* B₁相当量として計算した。

TPD 40γ は反応時間0分で20.75γがB₁に還元され51.9%の還元率を示し、反応時間10分で40.01γがB₁に還元され100%の還元率を示す。以後、反応時間20分、30分では逆に還元率が減少してきている。この理由は前に述べた。TOED 40γ は反応時間0分で3.24γがB₁に還元され8.1%の還元率を示し、以後次第に還元率が上昇し反応時間30分で36.48γがB₁に還元されて91.2%の還元率を示した。TTFD 40γ は反応時間0分で11.21γがB₁に還元され28.0%の還元率を示し以後次第に還元率が上昇し反応時間30分で39.82γがB₁に還元され99.6%の還元率を示した。この結

果から TPD は TOED, TTFD に比べて比較にならぬほどB₁への還元速度が早く、遙かにおくれて TTFD, TOED の順となることが明らかとなつた。

(2)肝浸出上清を各管に加えたときの管内溶液の温度が0°C であつた場合の実験結果は第4表(1)(2)に示した。表示方法は前の実験と同じである。

第4表(1) 最終稀釈濃度500倍の白鼠肝浸出上清による TPD, TOED, TTFD のB₁への還元

反応時間 (反応温度)	添加B ₁ 誘導体	TPD	TOED	TTFD
		(40γ) 添加	(40γ) 添加	(40γ) 添加
0' (0°C)		4.83γ (12.1%)	1.36γ (3.4%)	1.64γ (4.1%)
10' (37°C)		30.13γ (75.3%)	16.28γ (40.7%)	21.05γ (52.6%)
20' (37°C)		38.06γ (95.2%)	21.05γ (52.6%)	23.88γ (59.7%)
30' (37°C)		32.04γ (80.1%)	22.90γ (57.3%)	24.90γ (62.3%)

第4表(2) 最終稀釈濃度500倍の白鼠肝浸出上清による TPD, TOED, TTFD のB₁への還元

反応時間 (反応温度)	添加B ₁ 誘導体	TPD	TOED	TTFD
		(40γ) 添加	(40γ) 添加	(40γ) 添加
0' (0°C)		7.89γ (19.7%)	2.21γ (5.5%)	2.91γ (7.3%)
10' (37°C)		39.99γ (100%)	24.90γ (62.3%)	32.64γ (81.6%)
20' (37°C)		38.72γ (96.8%)	32.64γ (81.6%)	32.64γ (81.6%)
30' (37°C)		38.06γ (95.2%)	34.05γ (85.1%)	37.08γ (91.9%)

第4表(1)と第4表(2)の差は肝浸出上清を作るために用いられたシロネズミがちがうだけである。第4表(1)をみると、TPD 40γ は反応時間直後で4.83γがB₁に還元されただけで、12.1%の還元率を示し、以後次第に還元率が上昇し、反応時間20分で38.06γがB₁に還元され、95.2%の還元率を示し、反応時間30分では遂に還元率は減少しはじめた。この還元率の減少の理由は前に述べたのと同じであろうと考える。TOED, 40γ は反応時間直後で1.36γがB₁に還元され、還元率3.4%を示し、以後還元率はゆるやかに上昇し、反応時間30分で漸く22.90γがB₁に還元され57.3%の還元率を示した。TTFD 40γ は反応直後で1.64γがB₁に還元され、4.1%の還元率を示し以後還元率は上昇し、反

応時間30分で24.90 γ がB₁に還元され62.3%の還元率を示す。第4表(2)をみると TPD 40 γ は反応直後で7.89 γ がB₁に還元され19.7%の還元率を示し、反応時間10分で既に39.99 γ がB₁に還元され100%の還元率を示し、以後逆に還元率は減少しはじめた。この減少の理由も前に述べた通りである。TOED 40 γ は反応直後で2.21 γ がB₁に還元され、5.5%の還元率を示し、以後次第に還元率は上昇し、反応時間30分で34.05 γ がB₁に還元され85.1%の還元率となった。TTFD 40 γ は反応直後で2.91 γ がB₁に還元され7.3%の還元率を示し、以後還元率は上昇し反応時間30分で37.08 γ がB₁に還元され、92.9%の還元率を示すに至った。この結果からも明らかに TPD はTOED, TTFDよりB₁への還元速度が早いことがわかった。又、TOEDとTTFDは還元速度に著しい差はないが少しくTTFDの方が還元速度が早い傾向にあった。

尚肝浸出上清を各管に加えたときの管内溶液の温度が10°Cのときと0°Cのときの反応時間0分における各B₁誘導体のB₁への還元状態を比べると温度の下降と共に反応直後におけるB₁への還元が抑制されることは勿論のことであるがこのように冷却していても尚還元反応が幾分起ることがわかった。

(3) 考 按

Alkyldisulfide 型B₁は血球、其の他諸臓器により容易にB₁へ還元されるものであるが松川²¹、鈴置²²の研究によればシロネズミ組織ではTPDの還元能は肝、脾、血球に強く脳、心、腎、筋では幾分弱いといひ、肝の稀釈抽出液中に酵素的活性因子と耐熱性の低分子因子の存在を予測し、後者は主としてCystein及びGlutathioneであるという。更に進んでは酵素的因子は脱水素と共転する新しい酵素であることをThumberg管を用いて推定している。又、一方小野山²³はTAD, TPDが臓器によつてB₁に復帰する機構に関し、蛋白のチオール基の意義を考慮している。内野氏²⁴はTPDはCysteineではB₁に復帰しがたいが肝磨潰液では20%復帰しうるといひ、更にこれを100°Cで加熱したものは失活するとのべてCysteine効果よりむしろ肝酵素の効果を重視している。以上の如く、Alkyldisulfide 型B₁をB₁に復帰させる臓器中の還元因子については未だ充分なことが明らかとなっていない。

著者は緒論で述べた如く本報では新しく合成されたTTFDの肝ホモチネートによる還元速度の測定及びTOED, TPDの夫との比較を行うと同時にこれら

Disulfide 型B₁のB₁欠乏予防効果と還元速度との間の関係を検討したのであるが、臓器還元因子については未だ不明の点が多いので本実験では酵素性因子耐熱性因子等に分けず総還元因子として行つたものである。実験の結果シロネズミ肝浸出上清によつてTPD, TOED, TTFD共に種々の程度にB₁に還元されたが特にTPDに於ては速かであつて、TOED, TTFD間には有意の差がなかつた。興味のあるのは肝浸出上清を加えた直後におけるB₁への還元状態である。肝浸出上清の最終稀釈濃度を50倍とする反応時間0分20°Cにおける還元率はTPDで99.8%還元され、TOEDは76.7%、TTFDは80.0%還元されている。更に肝浸出上清最終稀釈濃度を500倍とすると、反応時間0分、10°CではTPD51.9%、TOED 8.1%、TTFD 28.0%還元され、温度を0°Cにした場合はTPD 19.7%或は19.7%、TOED 3.4%或は5.5%、TTFE 4.1%或は7.3%還元されている。この様に20°Cで肝浸出上清を加えた直後でも著しいB₁への還元がみられ10°C或は0°Cにおいても尚B₁への還元が可成りみられるところから見ると酵素因子による還元以外に非酵素因子による還元も、存在するものであらうと考えられる。次に肝浸出上清によるB₁への還元速度とB₁欠乏予防効果との関係の有無についてであるが前報⁷⁾のシウマツB₁欠乏予防試験においてTPDが最もすぐれた効果を有し、TOED, TTFDはTPDに明らかに及ばず、TOED, TTFD間には著差は認められなかつたということと本報における肝浸出上清によるB₁への還元速度の測定結果TPDが最も早く還元され、TOED, TTFDははるかに遅くTOED, TTFD間に著差がなかつたということを考えあわすとやはり両者間に関係があるものと思われる。即ちAlkyldisulfide 型B₁は組織親和性乃至は組織細胞内への移行性という点ではB₁よりすぐれているがその他に一つは細胞内へ移行したAlkyldisulfide 型B₁が速かにB₁に還元され易いこともB₁として有効な作用を発揮するために必要であつてこの両条件が満足されたAlkyldisulfide 型B₁が最も効果を発揮するのではないかと考えられるのである。

(4) 結 論

シロネズミ肝浸出上清によりTTFD, TPD, TOEDをB₁へ還元せしめ、その速度を測定した所TPDが最も速かに還元され、ついでTTFD, TOEDの順となつたが、TTFD及びTOEDは共にTPDに比べてかなり著しく還元され難いことが明らかとなつ

た。
稿を終るに臨み御懇篤なる御指導と御校閲を賜った
恩師浜本教授に深甚なる感謝を捧げます。又終始懇切

に御指導を戴いた広島県庄原日赤病院小児科医長馬場
巽博士及び終始御協力を戴いた教室技術員中山静子氏
に心から感謝致します。

文 献

- | | |
|--|-------------------------------|
| 1) 藤原 Proc. Jap. Acad., 28, 156, 1952. | 4) 内野 ビタミン 6, 165, 629, 1953. |
| 2) 鈴置 J. Biochem. 40, 11, 1953. | 5) 南条 ビタミン 9, 290, 1956. |
| 3) 松川 ビタミン 5, 523, 1952. | 6) 小野山 ビタミン 7, 90, 1954. |
| 6, 285, 1953. | 7) 三宅 未刊 |

Studies on B₁-Effect of Thiamine Tetrahydrofurfuryldisulfide(TTFD) Part 3. The reduction TTFD to vitamin B₁ by means of the liver homogenate solution

By

Kenji Miyake

Department of Pediatrics Okayama University Medical School

(Director : Prof. Eiji Hamamoto)

The author studied whether or not TTFD can be readily reduced to vitamin B₁ as are TAD, TPD and TOED, and also investigated whether there is any correlation between the rate of such a reduction and the preventive effect of TTFD on B₁-deficiency in the lovebirds reported in the previous paper.

Selecting albino rats weighing about 50g and fed on a fixed amount of regular food and then sacrificing them, 1g of the liver is removed immediately and homogenized with calcium chloride solution. The liver homogenate solution is diluted 5-fold and 50-fold, and to these diluted solutions a fixed quantity of TOED, TPD, TTFD at the dilutions of 50-fold and 500-fold is added keeping temperature at 0°C, 10°C, 20°C or 37°C. Then the quantity of free B₁ is measured, immediately, 10, 20, and 30 minutes after the addition, and the rate of reduction is estimated.

As the results the rate of the reduction is greatest in TPD, followed by that in TTFD and TOED in the order mentioned. It has been clarified from these that both TTFD and TOED are far more difficult to be reduced as compared with TPD.