

Vitamin C 缺乏の窒素代謝に及ぼす影響について

昭和32年12月23日 受付

信州大学医学部生化学教室 (主任: 藤村紫郎教授)

櫻井武彦 渡辺勉 池上文哉

緒論

Vitamin C が窒素代謝に及ぼす影響については従来種々論じられている。

即ち Abderhalden^①は種々の Amino 酸の Amino 基分解に於て鉄銅或は Mangan の存在の元にては Vitamin C の触媒作用が著明なることを検し、この作用は l-Ascorbin 酸のみならず d-Ascorbin 酸によつても見られることを報告した。

Purr^②は Arginase 作用は Vitamin C によつて賦活されることを実験した。

又植物性蛋白酵素たる Papain の作用は Vitamin C により抑制されるが鉄の存在では Vitamin C は之を賦活することが知られている^{③④}。

著者等は Vitamin C 欠乏海猿に於て偶々その血清中の残余窒素が著しく増加している事実を認めたので果して之が Vitamin C の欠乏によるものか更に Vitamin C と組織 Cathepsin 及び Arginase との関係を追究し次の如き結果を得た。

実験及び結果

1. 実験動物及び飼料

実験にはすべて海猿を使用した。海猿は体重 500g 以上の完全に成熟したものをそろへ、雌雄は別々に飼育し雌に於ける妊娠、授乳等による影響を受けない様にした。

Vitamin C 缺乏食飼としては各種のものが発表されているが、本実験では下記組成のものを使用した。

フスマ	50
小麦粉	25
魚粉	25
大豆油	3
粗製食塩	1

以上の割合によく混合し、Kock の滅菌釜の中で 100°C で60分間加熱を行ひ、存在する微量の Vitamin C を不活化した。この食飼は粉末のまま授与し、水は別に与へた。この他肝油により、Vitamin A 1000単位、Vitamin D 100単位を4日毎に経口的に授与した。

2. 実験的 Vitamin C 缺乏食飼で飼育した海猿の体重の変化及び壊血病症状発現の状況

海猿を上記実験的 Vitamin C 缺乏食飼で飼育する

と、その経過にしたがつて、体重は第1表の如くに変化する。即ち Vitamin C 缺乏にしてから約20-30日平均して25日経過すると体重は急激に減少し、衰弱し遂には斃死するに至つた。この時体重の減少の他に壊血病の症状として、関節の腫脹、出血、腸出血。動作の遅鈍化、被毛の脆弱化、食慾不振等が現はれた。しかし歯芽の脱落を来したものは見られなかつた。これに反して上記実験的 Vitamin C 缺乏食飼に加ふるに1日 2mg. の l-Ascorbin 酸水溶液を経口的に授与した対照群は体重も増加し順調なる發育をとげるのが観察された。

体重の測定は食飼摂取量その他の条件により影響を受けるので毎日午後2時と時間を一定にして測定した。

3. 正常育発時及び壊血病罹患により斃死直前の海猿血清中の非蛋白性窒素、尿素窒素及び蛋白性窒素量について

海猿を実験的 Vitamin C 缺乏食飼と同時に l-Ascorbin 酸を1日 2mg. の割合に経口授与して飼育し、体重が安定した時に採血して正常時に於ける海猿血清中の非蛋白性窒素、尿素窒素及び蛋白性窒素を定量し、その後 l-Ascorbin 酸授与を停止し Vitamin C 缺乏食飼のみで飼育して壊血病に罹患せしめた。体重の減少が著明になり腸出血等の病状の発現をみた時に採血して血清につき上記各成分の定量を行つた。

血清非蛋白性窒素の定量は除蛋白操作を10%三塩素醋酸で行ひ Bang の微量窒素定量法により行つた。

血清中の尿素窒素の定量は柴田^⑤による Diacetylmonoxim を用いる比色法により行つた。即ち 0.1ml. の血清に 1.5ml. の水及び 1.4ml. の 3%三塩素醋酸を加へ10分後に濾過し、濾液 1.0ml. に 1.0ml. の 1% Diacetylmonoxim 5%醋酸溶液及び 1.0ml. の HCl・HClO₄ 混液を加へ水 2.0ml. を追加し30分間沸騰水中にて加熱(コルク栓をして)後3分間流水中で冷却し生ずる黄色を波長 478m μ . で Beckman 分光光度計により比色定量した。

結果は第2表の如くである。

以上の結果から正常育発時に於ける海猿の血清中の非蛋白性窒素の平均値は 39.2mg/dl. であるが壊血病罹患時に於けるそれは平均 58.2mg/dl. であり 18mg/

(g.)

実験的ビタミンC缺乏食飼により飼育した海狼の体重の変動

第1表

海狼番号	性別	Vitamin C 缺乏食飼による飼育経過日数																														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
No. 4	♂	700	700	700	720	720	750	750	750	730	740	720	730	720	680	680	660	680	700	710	680	650	620	580	500	520+						
No. 5	♂	550	540	560	540	540	540	500	520	520	530	540	540	540	540	520	510	450	480	460	540	430	400	380	360	320+						
No. 6	♀	650	680	700	690	680	670	680	680	670	670	660	640	640	650	650	610	580	580	580	550	540	530	510	500	480	460	460+				
No. 7	♀	480	500	500	520	520	530	520	500	500	500	500	480	480	470	440	440	420	420	420	400	390	380	360	340	340	320+					
No. 8	♂	570	580	580	590	600	610	600	610	620	600	600	600	580	600	590	580	580	560	550	540	540	520	500	480	460	440	430	420+			
No.14	♂	520	530	500	550	560	550	550	550	560	550	560	580	570	570	560	540	540	520	500	460	450	420	400	400+							
No.22	♂	460	460	460	640	480	460	450	460	400	890	360	380	360	400	380	380	380	380	350	360	340	330	320	300+							
No.25	♂	630	570	570	550	530	540	540	550	540	560	550	560	560	560	560	520	550	530	520	500	460	440	430	420	410	380+					

dlの上昇を示している。即ち増加率は約45%である。

この中尿素窒素は正常発育時に平均 23.2mg/dl. であるのに対して痲血病罹患時には平均 42.4mg/dl. で約 19mg/dl. の増加を示して居る。そして尿素窒素以外の非蛋白性窒素即ち非蛋白性窒素から尿素窒素を減じたものは正常時平均 15.2mg/dl. 痲血病罹患時のそれは 15.8mg/dl. で殆ど普及はない。故に痲血病罹患により斃死直前の海狼の血清中の非蛋白性窒素の増量は尿素窒素の増量によるものと考へられる。

4. 実験的 Vitamin C 缺乏食飼で飼育経過中の海狼血清の非蛋白性窒素, 尿素窒素及び蛋白性窒素の変動

実験 3. によつて痲血病に罹患し斃死直前に於いては血清中の非蛋白性窒素特にその中尿素窒素の著明なる増量を示す事が明らかとなつた故次に Vitamin C 缺乏食飼で飼育している海狼がどの位期間を経過すればそれらの各成分が増加して来るかを知る為次に次の実験を行つた。

即ち, 正常発育時, Vitamin C 缺乏食飼で飼育経過中の時期, 及び斃死直前の各段階について同一動物について経過を追つて各成分の定量をする。結果は第3表の如くである。

以上の結果から海狼が Vitamin C 缺乏食飼による飼育によつて痲血病に罹患した時, 血清中の非蛋白性窒素特に尿素窒素の著明なる増量を認める様になるのは飼育期間約20日を経過して急激なる体重の減少がみられる様になつてから起ると云ふ事が明らかとなつた。

5. 正常発育時及び痲血病罹患海狼の肝, 臓, 腎臓, 脾臓, 大脳及び筋肉 Cathepsin の測定

以上の実験に依り痲血病罹患海狼に於いて体重が急激に減少する時期から血清中の非蛋白性窒素ことに尿素窒素の増量が認められる事が明らかとなつた故, その時期に体蛋白の崩壊が起つている事が考へられるが, これを確める為組織中に存在する蛋白酵素である Cathepsin の測定を行つた。

本実験の Cathepsin 測定には Anson^{⑤⑥}に依る変性 Hemoglobin を基質として使用した。即ち, 加熱と醋酸により変性させた 2% Hemoglobin (牛血球から作る) pH. 3.7 を基質として用い酵素液としては肝, 腎, 脾, 大脳及び筋肉の 0.15M 食塩水による 10% Homogenate を使用した。

反応は基質 5.0ml. に 1.0ml. の各組織 Homogenate を加へ 37° ± 0.5°C で 10分間反応させ, これに 10.0 ml. の 0.3M 三塩素醋酸を加へ酵素作用を停止し, 濾過し, 透明なる濾液 5ml. に 10.0ml. の 0.5N 苛性ソーダ溶液及び 3.0ml. の Folin の Phenol 試薬を加へ生

第2表(A) 正常発育時に於ける海狸血清中の非蛋白性、尿素及び蛋白性窒素量

海狸 番号	性 別	体重 g.	血清総窒素量 mg/dl.	血清蛋白性 窒素 mg/dl.	血清非蛋白性 窒素 mg/dl.	尿素窒素 mg/dl.	非蛋白性窒素 - 尿素窒素 mg/dl.
4	♂	720	942.5	604.0	38.5	21.0	17.5
5	♂	500	867.0	825.5	41.6	25.0	16.6
6	♀	670	888.0	846.4	41.6	—	—
7	♀	480	844.0	806.5	37.5	25.5	13.0
8	♂	600	827.5	789.0	38.5	—	—
14	♂	520	780.8	742.0	38.8	19.0	19.8
21	♀	600	—	—	35.0	25.5	9.5
平均値			858.3	822.0	39.2	23.2	15.3

第2表(B) 瘰癧病罹患時の海狸血清中、非蛋白性、尿素及び蛋白性窒素量

海狸 番号	性 別	体重 g.	血清総窒素量 mg/dl.	血清蛋白性 窒素 mg/dl.	血清非蛋白性 窒素 mg/dl.	尿素窒素 mg/dl.	非蛋白性窒素 - 尿素窒素 mg/dl.
4	♂	520	786.8	731.0	55.8	43.0	12.8
5	♂	360	920.1	857.0	63.1	50.0	13.1
6	♀	480	—	—	49.5	36.5	13.0
7	♀	380	740.2	693.4	46.8	34.0	12.8
8	♂	420	688.0	633.0	55.0	40.0	15.0
14	♂	400	660.3	607.0	53.3	33.5	18.9
21	♀	350	762.0	728.0	34.0	25.0	9.0
17	♂	300	746.0	696.7	49.3	29.0	20.3
22	♂	300	—	686.0	—	96.0	—
19	♂	300	903.0	789.5	112.5	—	—
25	♂	380	618.0	543.5	74.5	58.0	16.5
18	♀	300	805.0	759.6	45.4	32.0	13.4
平均値			763.0	702.3	58.2	42.4	15.8

第3表

海狸 番号	瘰癧 性	ビタミン C 欠 乏 に よ る 育 日 数	体重 g.	血清総窒素 mg/dl.	血清蛋白性 窒素 mg/dl.	血清非蛋白性 窒素 mg/dl.	尿素窒素 mg/dl.	非蛋白性窒素 - 尿素窒素 mg/dl.
14	♂	0	520	780.8	742.0	38.8	19.0	19.8
		12	580	—	—	—	18.5	—
		19	500	—	—	—	22.0	—
		22	450	—	—	—	31.8	—
		26	400	690.3	607.0	53.3	33.5	19.8
8	♂	0	600	827.5	789.0	38.5	—	—
		20	500	—	—	—	17.5	—
		24	440	—	—	—	33.5	—
		26	400	688.0	633.0	55.0	40.0	15.0
4	♂	0	700	942.3	903.8	38.5	21.0	17.5
		17	660	—	826.8	37.3	22.0	15.3
		25	550	—	—	—	43.5	—
		26	520	786.8	731.0	55.8	44.0	11.8

じた青色を 660m μ の波長で比色した。同時に基質に酵素液を添加する前に三塩素醋酸溶液を加へ次いで酵素液を加へ、後は本試験と同様に処理したものを対照として、この値を本試験の値から減じて補正を行った。

Cathepsin の量は Tyrosine を用いて作成した標準曲線から Tyrosine の量によつて表はされる。

Anson による Cathepsin 単位は次の様に表はされている。Cathepsin 1 単位は 6.0ml. の基質酵素混液が 37°C に於いて 1 分間に生成する三塩素醋酸に依るよる非沈澱性の、Phenol 試薬による発色物質が 1 milliequivalent の Tyrosine に相当する量をもつて表はす。

故に次の式から Cathepsin 単位を計算した。

$$\text{Cathepsin 単位, [C. u.]}^{11b} = \frac{E \times 16}{5 \times 10}$$

E: 濾液 5.0ml. 中の Tyrosine として表はされる Foline の Phenol 試薬による発色物質の量 (Tyrosine の milliequivalent で表はす)
0.15mg. の Tyrosin は 0.00083 milliequivalent に相当する。

以上の方法によつて測定した各臓器の Cathepsin は第 4 表の如くである。

第 4 表の結果から壊血病罹患海狼に於いては対照の正常群に比して肝、腎、脾及び筋肉いづれでも Cathepsin の作用の亢進が認められるが、大脳では殆

ど変化が観られない事が明らかとなつた。

6. 壊血病罹患海狼の肝腎 Cathepsin に対する l-Ascorbin 酸添加による影響

実験 5. の結果から壊血病罹患海狼の各臓器に於ては Cathepsin が著明に亢進している事が明らかとなつたが、その亢進が Ascorbin 酸缺乏自身によつて生ずる現象であるか、又その他の原因によるものであるかを知る為に次の実験を行った。

即ち壊血病罹患海狼の組織に l-Ascorbin 酸を添加して、Cathepsin がどの様に变化するかを検した。酵素液には壊血病罹患海狼の肝、腎 10% Homogenate を使用した。前記の様に、調製した酵素液 1ml. を用い基質には前記の 5ml. の 2% Hemoglobin 溶液に 1ml. の 0.2N 醋酸及びこれに 50r/ml の割合になる様に l-Ascorbin 酸を溶解したものを各添加し、各に酵素液を作用させ Cathepsin を測定した。この場合結果は前記の 0.3M 三塩素醋酸濾液 5ml. 中の Tyrosin の量 mg. で表はした。

なおこの実験で l-Ascorbin 酸を 0.2N 醋酸に溶解したのは 2% Hemoglobin 基質溶液はこの調製の時醋酸をこの割合に加へてあるのでこれを用ひて反応混液中の pH の変動を防止するためであつた。

結果は次の第 5 表の如くである。

以上の結果から壊血病罹患海狼の肝腎に於ける

第 4 表 (A) 正常発育時に於ける海狼の肝、腎、脾、大脳及び筋肉の Cathepsin 分布

海狼 番号	性 別	肝 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	腎 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	脾 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	大 脳 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	筋 肉 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴
32	♂	2.09	2.05	3.13	0.87	0.32
33	♂	2.39	2.27	3.38	0.795	0.32
34	♂	1.93	2.62	3.61	0.81	0.32
平均値		4.14	2.31	3.39	0.8.	0.32

第 4 表 (B) 壊血病罹患海狼の肝、腎、脾、大脳及び筋肉の Cathepsin 分布

海狼 番号	性 別	肝 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	腎 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	脾 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	大 脳 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	筋 肉 [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴
17	♀	2.83	4.11		0.725	0.41
14	♂	3.31	4.78	3.86	0.795	0.69
22	♂	3.86	3.91	4.76	0.94	1.92
19	♂	3.17	4.75	4.59	0.87	0.41
21	♂	3.24	3.98	4.51	0.87	1.10
25	♂	3.46	3.98	3.58	0.87	0.80
18	♀	3.13	2.80	5.05	0.795	1.13
平均値		3.29	4.04	4.38	0.84	0.92

第 5 表 壊血病罹患海狼の肝腎 Cathepsin に対する L-Ascorbin 酸添加による影響

海狼番号及び性	体重 mg.	組 織	酵 素 液 (1ml. Cathepsin 単位)	基 質 組 成	結 果 (濾液 5.0ml 中の Tyrosine mg.)
20 ♂	450	肝 臓	3.17×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 1.0ml. 0.2N 醋酸	0.179
			3.17×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 50r Ascorbin 酸 (1.0ml. 0.2N 醋酸)	0.244
		腎 臓	2.80×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 1.0ml. 0.2N 醋酸	0.158
			2.80×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 50r Ascorbin 酸 (1.0ml. 0.2N 醋酸)	0.161
24	300	肝 臓	3.31×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 1.0ml. 0.2N 醋酸	0.187
			3.31×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 50r Ascorbin 酸 (1.0ml. 0.2N 醋酸)	0.223
		腎 臓	3.18×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 1.0ml. 0.2N 醋酸	0.18
			3.18×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 50r Ascorbin 酸 (1.0ml. 0.2N 醋酸)	0.212
23	340	肝 腎	2.78×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 1.0ml. 0.2N 醋酸	0.157
			2.78×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 50r Ascorbin 酸 (1.0ml. 0.2N 醋酸)	0.18
		腎 臓	3.98×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 1.0ml. 0.2N 醋酸	0.225
			3.98×10^4 [C. u.] ^{11b}	5.0ml. hemoglobin 基質溶液 + 50r Ascorbin 酸 (1.0ml. 0.2N 醋酸)	0.255

Cathepsin 作用の亢進状態は Ascorbin 酸の添加によりさらに一層の増進を来す事が明らかとなつた。即ち Ascorbin 酸は Cathepsin を活性化する作用を有し、よつてこの事から壊血病罹患海狼の各組織に於ける Cathepsin 作用の亢進は組織中の Ascorbin 酸そのものゝ缺乏によるものではないと考へられる。

7. 正常発育海狼の肝及び腎臓 Cathepsin に及ぼす壊血病罹患海狼の血清添加の影響

実験 5. に於ける壊血病罹患海狼の各組織に於いて Cathepsin 作用が著明に亢進している事が明らかとなつたが、これは壊血病罹患海狼の血清の中に存在する或る因子によつていられるかも知れないと考へられる。これを確かめるため次の実験を行つた。

前記基本食飼に Ascorbin 酸を添加して体重が増加

を示している正常海狼の肝、腎について一つは普通方の法により得た Homogenate により一つは Homogenate にする時に、壊血病罹患海狼の血清を 1ml 宛添加したものを作り、これによつて Cathepsin の測定を行つた。

結果は次の第 6 表の如くである。

この結果から壊血病罹患海狼の血清の添加は正常海狼の肝、腎、Cathepsin には影響を及ぼさぬ事が明らかとなり、壊血病罹患海狼の血清の中に Cathepsin 作用を亢進さす因子の存在は考へられない。

Arginase の定量

Arginase の定量には Van Slyke^②の方法を使用したが反応生成物の尿素の定量には Engel^⑧の方法を使用して 1 つの Arginase 定量法を組立て、行つた。

第6表 正常発育海狸の肝、腎 Cathepsin に及ぼす腹血病海狸の血清添加の影響

海狸番号		酵素液中の Cathepsin 単位		基質溶液	反応時間 温度	結晶化醋酸濾液 5ml. 中 Tyrosine mg.
32	肝 臓	2.09×10^{-4} [C. u.] ^{11b}	血清非添加	5ml. ヘモグロビン	10分 37°C	0.118
			血清添加	"	"	0.12
	腎 臓	2.05×10^{-4} [C. u.] ^{11b}	血清非添加	"	"	0.116
			血清添加	"	"	0.113
33	肝 臓	2.39×10^{-4} [C. u.] ^{11b}	血清非添加	"	"	0.135
			血清添加	"	"	0.130
	腎 臓	2.27×10^{-4} [C. u.] ^{11b}	血清非添加	"	"	0.128
			血清添加	"	"	0.12
34	肝 臓	1.93×10^{-4} [C. u.] ^{11b}	血清非添加	"	"	0.109
			血清添加	"	"	0.115
	腎 臓	2.63×10^{-4} [C. u.] ^{11b}	血清非添加	"	"	0.148
			血清添加	"	"	0.15

試 薬

1. Arginine 溶液:
0.85 M. PH. 9.5 (Glass electrode),
9.00gm. の Arginine -HCl に 1.6ml. の 18N NaOH を加え水で 50ml. とする。
2. 10%三塩素醋酸
3. 氷醋酸
4. 5% Xanthidrol 溶液 (5gm. Xanthidrol を 100 ml. の無水 Methanol に溶解す。)
5. 50% (容量) H_2SO_4
6. 洗滌用 Dixanthyl 尿素, 飽和 Methanol (濾過後使用)
7. 酵素液

海狸の肝、臓の 0.15M 食塩水抽出液を使用した。即ち断頭によつて急激に屠殺した海狸の肝臓を直ちに氷冷し出来るだけ速かに 1.0mg. を秤り 9ml. の 0.15mol NaCl 水を加へ Homogenizdr にかけて 10% Homogenate を作り、これを遠心沈澱して上清をとり、これを適当に稀釈 (後の尿素定量に一定の制限があるため)、普通は 5 倍に稀釈して、この 1.0ml. を酵素液とした。Van Slyke の原法では $MnCl_2$ 溶液を加へて Arginase の活性化を計っているが、本実験は出来るだけ自然のまゝで行ふためこれを行はなかつた。

操 作

pH9.5 に規正した 0.5ml. の基質溶液を小試験管にとり、これに 1.0ml. の上記酵素液を加へ、直ちに静かに両液を混合し、正確に 10 分間 25°C で (恒温槽を

使用した) で培養し、後 1.0ml. の 10% 三塩素醋酸を加へる。これにより酵素作用は停止する。その後この液を 15 分間室温に放置し、遠心沈澱して透明なる上清を得る。この上清を傾斜して清浄なる試験管に移し、正確に稀釈する本実験では 10 倍稀釈が最も良い結果を得た。この稀釈上清 1.0ml. を遠心管にとり 1ml. の氷醋酸を加へ、混和して次に 0.2ml. の 5% Xanthidrol-methanol 溶液を加へさらによく混和して氷室中に放置すると、白色小塊状の Dixanthyl 尿素的結晶が折出して来る。約 6 時間氷室で放置後出して室温に到らしめる。これに 4ml. の Dixanthyl 尿素飽和の Methanol を管壁を洗いながら加へ、ガラス棒で混和して均等にす。室温で 15 分間放置後遠心沈澱して、上清を捨て Dixanthyl 尿素的結晶を 3 回以上 Dixanthyl 尿素飽和 Methanol, 水 (3:1) で洗い、50% H_2SO_4 を加へ生ずる黄色を Beckman Spectrophotometer Model DV 型を使用して 390m μ . の波長で測定した。

検 討

最初の Arginine と、酵素液との反応は Van Slyke, Archibald の条件そのまゝであるが後半の尿素的測定は全く違つた方法となつた。即ち、Van Slyke の原著では反応停止に 1ml. の H_2SO_4 - H_3PO_4 混合液や 15% HPO_3 を使用している。そして尿素的定量には 3% の Isonitrosopropiophenone を使用している。

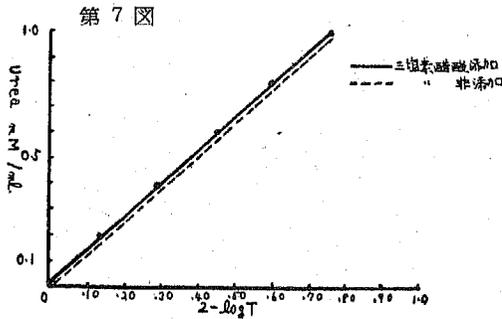
この時は定量出来る尿素的量の幅が大きくて便利と思はれるが、試薬が入手困難の為 Xanthidrol を代りに使用したのである。又 Engel, Engel の Xanthidrol に

よる尿素定量は血清中の尿素定量用に組立てられてあり、除蛋白には Na_2WO_4 を使用している。しかしこれは酵素作用を停止するには、種々の不都合があるので、代りに10%の三塩素醋酸を使用した。この為に三塩素醋酸の存在の下で尿素と、Xanthidrol の結合が影響を受けるかどうかを検討する必要が生じ次の様な実験を行つた。

(1) 標準尿素溶液 (10mM/ml.) を10倍稀釈するのであるが、この時は標準尿素溶液 1.0ml. に 1.0ml. の10%三塩素醋酸 0.5ml. の Arginine 基質液を加へ、それから10倍になる様水で稀釈した。その理由は酵素反応停止の時の三塩素醋酸使用も大体この条件によつて稀釈されるからである。この液は 1.0ml. 中に 1.0 mM. の尿素を含有している故これを適当に稀釈して、0.2~1.0mM/ml. の標準液を作り、これに0.2ml. 5% Xanthidrol methanol の溶液を加へ以下は前記の様に行つた。

(2) 標準尿素溶液の稀釈処理はすべて水で行つて以下は全く前記と同様に処置した。

この両者の吸光係数を比較すると第7表の様になつた。



この第7表によつて両者の間には殆んど差が無く、10%三塩素醋酸が十分使用可能の事が明らかとなり、

又この時の発色と尿素濃度の間には 0.1~1.0mM/ml. の間に於いて Lambert-Beer の法則による比例関係が存する事が証明された。

計 算

この結果から、Arginase 濃度は次の式から計算される。

$$E = 2.5 \text{ UVC}$$

$$E = \text{Arginase 濃度}$$

$$U = \text{最後に尿素の定量を行つた溶液中の尿素の量を Micromole で表はしたもの}$$

$$V = \text{酵素液の稀釈倍数}$$

$$C = \text{反応温度に関する係数で Van Slyke によると } 25^\circ\text{C に於ける値を } 1.0 \text{ としその他の反応温度の時に補正の為乗ずる係数}$$

$$2.5 = \frac{2.5}{1.0} \times \frac{10}{1} \times \frac{1}{10}$$

$$\bigcirc \frac{2.5}{1.0} = \frac{\text{基質液} + \text{稀釈酵素液} + \text{10\%三塩醋酸}}{0.5\text{ml.} + 1.0\text{ml.} + 1.0\text{ml.}} \times \frac{\text{上記分子の内から尿素定量に使用した液量 } 1.0\text{ml.}}{\text{尿素定量}}$$

$\bigcirc^{10}/1$: 上式の分子の尿素定量に使用された反応濃液 1.0ml. が10倍に稀釈されているので、最後に10を乗ずるのである。

8. 正常発育海狸及び糖尿病海狸の肝腎及び脾の Arginase 活性度測定

正常発育海狸及び糖尿病海狸の肝腎及び脾の Arginase の活性度を Van Slyke の方法により測定した。同時に同一動物について肝腎 Cathepsi 及び血清中の非蛋白性窒素を定量した。

結果は次の第8表の如くである。

但し Arginase 測定の中、腎については肝とは少し異つている即ち Arginase の測定の時対照として抽出した酵素液について Arginase が反応しない様にしたものについて中に存在する尿素の量を測定したのである

第8表 糖尿病罹患海狸の肝腎脾 Arginase 肝脾 Cathepsin 及び血清中の非蛋白性窒素及び尿素窒素量

海狸番号	性別	体重 gm.		血清非蛋白性窒素 mg/dl.	尿素窒素 mg/dl.	非蛋白性窒素 - 尿素窒素 mg/dl.
		罹患前	罹患時			
42	♂	500	330	—	35.0	—
35	♂	560	350	68.0	50.0	18.0
36	♀	500	350	43.0	30.0	13.0
48	♂	520	350	45.0	33.0	12.0
39	♂	580	340	55.5	—	—
38	♀	500	260	49.5	35.0	14.5
平均 値				50.2	36.6	11.9

第8表(A) 続

海 狸 番号	Arginase 単位			Cathepsin [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	
	肝 臓	腎 臓	脾 臓	肝 臓	腎 臓
42	76.5	negligible	0	1.60	1.85
35	44.8	"	0	1.29	—
36	45.6	"	0	1.35	2.60
48	37.3	"	0	1.33	2.80
39	86.5	"	0	1.15	—
39	59.0	"	0	—	2.24
平均値	58.3	"	0	1.34	2.37

第8表(B) 正常發育海狸の肝腎脾 Arginase 肝腎 Cathepsin
及び血清中の非蛋白性窒素及び尿素窒素

海 狸 番 号	性 別	体 重 gm.	血清非蛋白性 窒 素 mg/dl.	尿 素 窒 素 mg/dl.	非蛋白性窒素 — 尿素窒素
47	♂	500	35.0	23.0	12.0
50	♂	540	40.5	19.5	21.0
51	♂	360	34.0	21.0	13.0
52	♀	450	38.0	—	—
平 均 値			36.4	21.2	15.3

第8表(B) 続

海 狸 番号	Arginase 単位			Cathepsin [C. u.] ^{11b} × 10 ⁴	
	肝 臓	腎 臓	脾 臓	肝 臓	腎 臓
47	31.8	negligible	0	1.06	1.50
50	32.0	"	0	1.03	1.64
51	36.6	"	0	0.93	1.74
52	30.5	"	0	0.98	—
平均値	32.7	"	0	1.00	1.63

が肝の場合はこの対照即ち酵素液中尿素は殆ど0であつたが、腎の場合は本実験及び対照実験共殆ど同量の尿素が定量されその差及び Arginase による尿素の量が殆ど認められない。

即ち腎では組織中に遊離状態で相当量の尿素が存在する事が判つた故に脾では本実験対照実験共に尿素は検出々来なかつた。

以上の結果から壊血病罹患海狸の肝 Arginase が正常發育海狸のそれに比較して著明に亢進しているのが見られ同時に肝腎 Cathepsin の亢進も存在している事が明らかとなつた。

9. 壊血病罹患海狸の肝 Arginase に対する Ascorbin 酸の影響

実験 8. の結果から壊血病罹患海狸の肝 Arginase 活

性が亢進している事が判明したのでその亢進が Ascorbin 酸の缺乏によつて生ずる現象であるか又その他の原因によるものであるかを知る為次の実験を行つた。

方法は Cathepsin の時に Ascorbin 酸を添加したと全く同様に肝10%ホモヂネート 1ml. 中に 50r の l-Ascorbin 酸を含む様に之を前記 Arginase 活性測定の時と全く同様に酵素液として使用した。

結果は第9表の如くである。

この実験 9. の結果から壊血病罹患海狸の肝 Arginase 活性亢進は Ascorbin 酸の添加によつても著明なる変化は見られない事が判明した。

第9表 壞血病罹患海狼の肝 Arginase に対する Ascorbin 酸添加の影響

	酵素液	結 果 Arginase 単 位
36 ♀	5倍稀釈肝抽出液 1ml.	アスコルビン酸添加 44.0
	"	" 非添加 45.6
38 ♀	"	アスコルビン酸添加 57.2
	"	" 非添加 59.0
48 ♂	"	アスコルビン酸添加 38.0
	"	" 非添加 37.3

10. 正常發育海狼の肝 Arginase に及ぼす壞血病海狼の血清添加の影響

実験 8. に於ける壞血病罹患海狼の肝臓中の Arginase が著明に充進している事が明らかとなつたが、これは壞血病罹患海狼の血清中に存在するかも知れないある因子によつてゐるかも知れないと考へられる為それを確める為次の実験を行つた。

前記基本食飼に Ascorbin 酸を添加して体重が増加を示している正常海狼の肝組織について一つは普通の方法により得た抽出液について一つは抽出液を作る時壞血病罹患海狼血清 1ml. 添加したもの、この二通りの酵素液を作りこれによつて Arginase の測定を行つた。

結果は次の第10表の如くである。

この結果から 壞血病海狼血清添加は正常海狼の肝 Arginase には影響を及ぼさぬ事が判明し壞血病罹患海狼の血清の中に Arginase 作用を充進さす因子の存在は考へられない。

上記の実験から壞血病罹患海狼の血清中の非蛋白性

窒素ことに尿素の増加は同時に大脳を除く各組織の Cathepsin 及び肝 Arginase の著明の充進をともない体内で蛋白質分解が起つている事を暗示しているが、この状態は飢餓時の変化とよく類似しているので、飢餓状態にした海狼につき、血清中の非蛋白性窒素尿素窒素各組織 Cathepsin, 肝 Arginase 活性度を検した。

第10表 正常海狼肝 Arginase に対する壞血病海狼血清の及ぼす影響

海狼 番号	酵 素 液	結 果 Arginase 単 位
47 ♂	5倍稀釈肝抽出液 1ml.	血清添加 30.4
	"	" 非添加 31.8
50 ♂	"	血清添加 30.7
	"	" 非添加 32.0
51 ♂	"	血清添加 36.8
	"	" 非添加 36.6

11. 海狼の飢餓状態に於ける血清中非蛋白性窒素尿素及び蛋白性窒素の変動

正常の發育をとげている海狼に水と l-Ascorbin 酸を毎日 2mg を経口投与するだけの絶食とし飢餓状態としてその前、経過中、飢餓時の各成分を測定した。

結果の次の第11表の如くである。

この結果から Ascorbin 酸を投与していても飢餓状態に於いては海狼血清成分中尿素窒素の著明な増量が認められた。

13. 飢餓海狼の肝腎脾大脳及び筋肉中に於ける Cathepsin 及び肝 Arginase の測定

正常の發育をとげている海狼に水と Ascorbin 酸を毎日 2mg を経口投与するだけの絶食とし飢餓状態と

第 11 表 飢餓時に於ける海狼血清中の非蛋白性尿素及び蛋白性窒素

海狼 番号	飢餓時間数	体 重 変 動 gm.	血清蛋白窒素 mg/dl.	非蛋白性窒素 mg/dl.	尿 素 窒 素 mg/dl.	非蛋白性窒素 - 尿素窒素 mg/dl.
12 ♂	前	460	872.5	37.7	22.5	15.2
	後 72時間	420	783.0	48.5	34.5	14.0
22 ♂	前	460	873.8	31.2	15.0	16.0
	後 72時間	390			80.0	
23 ♀	前	460	928.3	31.7	18.5	13.2
	後 189時間	340	864.3	53.3	38.0	15.3
平均値	正 常 時		891.5	33.5	18.6	14.9
	飢 餓 状 態		823.6	50.9以上	50.8	14.6

して72~96時間経過した時それを屠殺前記の方法により各組織の Cathepsin 及び肝 Arginase を測定した。

結果は次の第12表の如くである。

この結果から飢餓によっても肝 Arginase が正常海狸のそれに比して著明なる亢進をしているのが認められる。

総括及び結論

(1) 海狸をフスマ、黒粉及び小麦粉を主成分とする実験的 Vitamin C 缺乏食飼で飼育すると、約20日経過後徐々に壊血病症状をおこし、斃死するに至る。対照として同一飼料に加ふるに1日料 2mg. の l-Ascorbin 酸を経口投与すると順調な発育をとげる。

(2) この組成の飼料で海狸を飼育し壊血病症状が現はれて来ると血清中の非蛋白性窒素特に尿素窒素の著明なる増量が起つて来る。しかしその他の非蛋白性窒素量にはあまり変化がみられなかつた。この現象が起るのは Vitamin C 缺乏食飼で海狸を飼育し、20日位経過し体重が急激に減少し斃死直前になつてから起る事を確認したその以前の状態では例へ体重が徐々に低下して居ても血清中の尿素窒素の増量は見られなかつた。

(3) Vitamin C 缺乏海狸に於いて、この血清中尿素窒素の増量を示す時期には肝、腎及び脾臓の Cathepsin の作用が正常発海狸のそれに比して著しく増進している。しかし大脳の Cathepsin はあまり変化が無いのを観察した。

(4) 同時にこの時期には肝 Arginase の作用 (Van Slyke 法による測定) が正常海狸に比較して著明に亢進しているのを認めた。

(5) この作用の亢進している海狸の肝、腎 Cathepsin 酵素液に l-Ascorbin 酸を添加するとその作用はさらに増進する事が認められ、正常動物の肝腎 Cathepsin 酵素液に壊血病罹患海狸の血清を添加してもその作用に変化は認められなかつた。この実験から壊血病罹患海狸の各臓器に於ける Cathepsin 作用の亢進は Ascorbin 酸そのものが組織中に缺乏する事による現

象ではなく、原因は他にあると考へられる。

(6) この作用の亢進を示している壊血病罹患海狸の Arginase 肝酵素液に同様に l-Ascorbin 酸を添加してもそれは何の影響も及ぼさなかつた。又この海狸血清を正常海狸肝 Arginase に添加してもそれには何の影響も与へなかつた。

この事実から Vitamin C 缺乏海狸の肝 Arginase 作用の亢進は組織中の Ascorbin 酸そのもの缺乏では無く、又この海狸血中には Arginase 肝作用を促進する様な因子は存在しないと考へられる。

(7) 海狸を絶食させ飢餓状態にするといくら Ascorbin 酸を投与しても72時間以上経過すると、血清中の非蛋白性窒素就中その尿素窒素が著明に増加するのがみられ、この時海狸の肝、腎 Cathepsin 及び肝 Arginase 作用は正常海狸に比較して著しく亢進しているのを認めた。

以上の結果から Vitamin C 缺乏食飼で飼育し、壊血病に罹患させた海狸血清中の尿素窒素の増量は、その未期に於ける食慾不振か、又は吸収不良により飢餓状態が起り、その結果体蛋白の急激なる崩壊を生し、その結果惹起されたものと考へる。

本実験を行うにあたり、懇切なる御指導を頂きました藤村紫郎教授に深く感謝いたします。

文 献

①Abderhalden: Fermentforschg, 15, 285, 360, (1937). ②Purr: Biochem. J. 27, 1703, (1933). ③Maschmann: Helmet: Z. Phys. Chem. 222, 215, (1934). Hoppe-Seylers Z. 224, 56, (1934). ④奥田: 成医学雑誌, 56, 88, (1937). 奥田: 成医学雑誌, 57, 99, 1938. ⑤Anson, M. L., J. Gen. Physiol., 20, 565 (1936). ⑥Anson, M. L., J. ibid, 20, 663 (1936). ⑦Van Slyke, D. D. and Archibald, R, M., J, Biol. Chem., 165, 293 (1946). ⑧Engel, M. G., and Engel F, L., J. Biol. Chem, 167, 535 (1946). ⑨Greenberg, D. M., The Enzyme 893 (1950). ⑩Kemp and A. J. M. Kita Van Hei,

第12表 (A) 飢餓海狸の肝腎脾大脳及び筋肉の Cathepsin の分布

海 狸 番 号	性 別	絶食による 体重の変動 g.		Cathepsin [C. v.] ¹⁰⁴					
				肝臓	腎臓	脾臓	大脳	筋肉	
1	♂	320	72時間	290	4.19	2.54	3.95	0.66	0.38
2	♀	380	96時間	290	3.72	2.26	3.67	0.69	0.42
3	♀	480	72時間	340	3.60	2.38	3.29	0.72	-
平均 値					3.84	2.39	3.63	0.69	0.40

第12表 飢餓海狸の肝腎 Arginase の分布

海 狸 番 号	Arginase 単位	
	肝 臓	腎 臓
1	74.3	negligible
2	61.8	"
3	74.3	"
平均値		70.1 "

Biochem J., 646, 56 (1954). @Juchi, I., and Miyazi R., medicine Biology (Japan) 36, 121, (1955)

On the Effect of Ascorbic Acid upon the Nitrogen Metabolism

Takehiko Sakurai, Tsutomu Watanabe, and Bunya Ikegami
Biochemical Institute, Faculty of Medicine, Shinshu University

The effect of ascorbic acid upon the nitrogen metabolism was studied in guinea pigs and the results could be concluded as follows.

At the end stadium of ascorbic acid deficiency

the content of non-protein nitrogen (N. P. N.) in the sera of guinea pigs increased remarkably. The increase of N. P. N. was almost due to that of urea. Also the cathepsin activity of the liver, kidney, spleen, and muscle, and the arginase activity of the liver increased conspicuously at the end of ascorbic acid deficiency. But these phenomena occurred also in the guinea pigs fasting for a long time on an excess of ascorbic acid, therefore the change of N. P. N. content in the sera and the cathepsin and arginase activity were not considered to be due to the effect of ascorbic acid deficiency itself but rather due to the effect of starvation caused by an anorexia following ascorbic acid deficiency.

Vitamin C と脂肪代謝について

(第一報)

昭和33年12月25日受付

信州大学医学部生化学教室 (主任: 藤村紫郎教授)

内 藤 実 桜 井 武 彦 手 塚 晃 次

Ascorbin 酸の脂質代謝に及ぼす影響に関しては多数の実験が行はれているが、必ずしも一定の結果が得られていない。且つ Ascorbin 酸缺乏動物については食欲の減退、壊血症及び脂質以外の養素の代謝異常の発現により、又その軽重によつて第二次に種々の程度の現象が現はれて真実の Ascorbin 酸缺乏の脂質代謝に及ぼす影響はとらえることは容易ではない。

v. Panteschenko-Jnreuck 及び Krant^①は Ascorbin 酸は脂肪酵素の Co-enzyme となると称し、Lanber^②、Master^③は Ascorbin 酸缺乏により体内 Esterase の減少を来すが、Ascorbin 酸代謝が上昇する時には血液、肝腎等の Esterase 量は増加すると称へている。

Felix, Mager^④は Ascorbin 酸を Clupein に結合せしめて脂肪分解酵素作用を有する物質を得たと報告している。

体内脂肪代謝に関しては Terbrüggen^⑤は Ascorbin 酸缺乏により、肝の脂肪変性を来すことを認めた。又他方 Kreitmeier, Steep は Ascorbin 酸は脂肪代謝に影響を与へないと報告し、Sbeppard, Mc. Henry^⑥は肝臓に於ける脂肪代謝に重要な作用を果すと報告している。

著者等は本実験に於て先ず Ascorbin 酸缺乏動物について肝臓血液の各種脂肪含有量、並びに副腎 Cholestrin 含有量を測定し、正常時の夫等と比較検討した。

実験及び結果

実験動物

実験動物としては成熟健康海狼を用い、教室内に於ける基礎飼料に2乃至3週間馴れしめて後実験に供した。Ascorbin 酸缺乏飼料には次の合成食を用いた。

}	麦 糠	50g
	魚 粉	25g
	小麦粉	25g
	大豆油	3g
	粗製食塩	1g
	肝 油	1g

この混合物を 100°C, 60分間 Autoclave 内で加熱したものを十分に投与する。別に水は飲むにまかせて与へる。

対照動物には上記 Ascorbin 酸缺乏食の外に Ascorbin 酸 1日 10mg. を毎日経口投与する。