Experimental Studies on the Influence of Parotin on Metabolism

By

Kyoichi YUASA

(Director, Prof. Shigeo Okinaka, Tokyo University, School of Medicine)

It is reported that Parotin caused a fall of serum calcium, total protein, non-protein nitrogen and amino-N in normal rabbits, an increase in A : G ratio of them and a decrease in urinary nitrogen in normal rats (Takaoka and Yamaguchi). An acceleration of C^{14} -glycine incorporation into rat liver protein and turn over rate of P^{32} -RNA in the rat liver after the administration of Parotin was observed (Ishikawa). On this basis Takaoka has presumed that Parotin may take a part in protein metabolism in animals.

This paper is presenting the results of the investigation designed to make clear the influence of Parotin on metabolism, especially on activities of several enzymes and oxydative phosphorylation in rats.

Following results are obtained :

1) An administration of Parotin produced an increase in the activities of liver cathepsine and glutamic-oxalacetic transaminase of the liver and the heart, whereas it caused a decrease in the activity of liver arginase. A decrease in the activity of serum alkaline phosphatase was noted in rabbits, while no change in liver alkaline phosphatase in rats was recognized after the injection of Parotin.

2) We have previously reported that the administration of Parotin accelerates the oxygen consumption by TCA cycle in the rat liver homogenates. As far oxydative phosphorylation is concerned, P : O ratio in the rat liver homogenates given Parotin in advance is demonstrated to be higher than that observed in control rats.

From the results mentioned above, a probable relation of Parotin with the growth hormone in regards with their enzymic actions was discussed in detail, because both of them play important roles in protein metabolism. Considering the protein accumulating and growth promoting actions of Parotin previously reported, the results of this experiment strongly suggest that Parotin may have a hormonal influence on process of protein metabolism. Furthermore, a possible working mechanism and indications of its clinical application of Parotin were discussed in this paper from the standpoint of physiological actions of adenosine-triphosphosphate.

A case report : Diabetes insipidus with Pubertas praecox & Hemiplegia dextra due to Ependymoma

Yoshimi MURAKAMI

Second Department of Internal Medicine (Director : Prof. G. KUSUNOKI),
Faculty of Medicine, Kyushu University.

A 12 year old male.

Clinical findings : Urinary 17-Ketosteroid excretion 12.2~19.6 mg/day. Thorn's test positive, BMR (-) 13%. Glucose tolerance increased. Relative lymphocytosis & eosinophilia. Urinary output 6~12 l/day. Serum ADS (+) 4.9 (Lloyd). TRR 87.2%. No urinary retention by intravenous injection of hypertonic saline solution & nicotine.

パロチンの新陳代謝に及ぼす影響

(I) パロチンの諸酵素に及ぼす影響

東京大学沖中内科

湯 浅 恭 一

緒 言

高岡¹⁾山口²⁾はパロチン注射が、健康家兎の血清カルシウム、総蛋白、残余窒素及びアミノ酸窒素を減少し、蛋白商 (A/G 比) を増加させ、健康白鼠の尿中窒素排泄を抑制すると報告し、之等の事からパロチンは蛋白代謝に関与するのではないかと提唱した。次いで高岡、石川³⁾は同位元素 C^{14} -グリシン及び P^{32} を用いてパロチンが C^{14} -グリシンの肝蛋白への取り入れを促進し、肝のリボ核酸の Turnover (代謝回転) を促進する事を認め、パロチンが蛋白代謝に影響を与える事を確実に証明した。又一方守⁴⁾は高岡等の成績を確認し、田坂等⁵⁾は家兎及び老人に於いてパロチン投与が体蛋白の排泄を防ぐと報告、佐々木等⁶⁾はパロチン適量投与が幼弱白鼠の発育を促進する事を認め、角尾⁷⁾は鶏胎児のカルシウム沈着促進を報告する等、いずれも高岡等の提唱を裏書するような成績が得られている。

今日迄蛋白代謝に関与するホルモンとして知られているのは、脳下垂体前葉の成長ホルモンを始めとして、副腎皮質ホルモン、男性ホルモン、インシュリン等が挙げられる。就中成長ホルモンは蛋白代謝に関して(1)窒素蓄積作用(尿中窒素排泄の抑制)、(2)血中アミノ酸窒素低下作用、(3)蛋白同化作用等が知られて居り、之等の作用が上述したパロチンの作用とよく一致している事は極めて興味深い。然るに成長ホルモンの酵素系に対する作用は①白鼠の血漿アルカリフォスファターゼを増加させるが、正常白鼠の酸フォスファターゼには影響を与えず、②肝カタラーゼを減少させ、③成熟雄性白鼠の肝アルギナーゼを減少させるのである¹⁰⁾。④肝及び腎の α アミノ酸酸化酵素、筋及び腎の琥珀酸脱水素酵素には特異的变化を与えず、⑤ Beaton 等によれば肝のトランスアミナーゼの中、アラニン-グルタミクトランスアミナーゼは成熟雄性白鼠では減少し、幼弱雄性白鼠では増加するが、アスパルチック、トランスアミナーゼには変化を与えない。又 Bartlett 及び Glynn によれば¹¹⁾、成長ホルモンは in vitro では下垂体剔出白鼠の肝及び腎トランスアミナーゼに影響を与えないが、in vivo では肝トランスアミナーゼを増加させると述べている。⑥ Mathies¹²⁾等によれば成長ホルモンは正常白鼠の肝カテプシンを増加させると報告して居り、Gaebler 及び Mathies¹³⁾は蛋白代謝に影響を与える酵素系と成長ホルモンとの関係について詳述しているが、パロチンの之等系に対する影響を検討する事は、成長ホルモンと対比して極めて興味深いものと考えられるので、以下の実験を行つた。

実験方法

体重100g 前後の雄性白鼠及び体重2kg 前後の雄性家兎を15時間絶食とし、パロチンの注射は所定の方法に従い体重毎 3mg を腹腔内に投与した。同時に対照群にはパロチンの溶媒である0.6%生理的食塩水を同量注射した。注射後所定の時間に断頭屠殺し、直ちに腹腔を開き、肝、心、脳を取り出す。次いでその必要量に生理的食塩水又は pH7.4の磷酸バッファーを加え、Potter-Elvehjem の Homogenizer によりホモジエネートを作り、アルカリフォスファターゼは Brock 氏法¹⁴⁾、アルギナーゼは Van Slyke 及び Archibald 氏法¹⁵⁾、カテプシンは Miller 氏法¹⁶⁾、グルタミク・アスパルチック・トランスアミナーゼは Tonhazy 氏法¹⁷⁾により測定した*。又血清アルカリフォスファターゼは家兎を用い、注射前及び後に耳静脈より採血して血

* 実験に使用した α -ケトグルタル酸は、米、California Foundation for Chemical Research 製品、アスパラギン酸は Merck 製品である

清を分離し, Bodansky 氏法¹⁸⁾により測定した。

実験成績

I. アルカリフォスファターゼ

a) 体重2kg 前後の家兎12匹を二分して一群を対照とし, 他の一群はパロチン3mg/kg を静注して, 前, 注射後3, 8, 24時間に採血した。

結果は第1図の如く, 注射前, 注射後3時間, 8時間, 24時間値が, 対照群では夫々, 2.23, 2.14, 2.39, 2.29と多少の動揺を示すのみであるが, 之に反してパロチン注射群では夫々, 2.20, 2.13, 1.87, 1.62と注射後は漸次減少して, 24時間で最低に達した。

b) 白鼠54匹を対照群14匹, パロチン注射後3時間, 6時間, 12時間及び24時間群各々10匹に分け, 所定の時間に屠殺し, 肝の10%ホモジエネートを作り, 之を酵素液として使用した。結果は第2図の如く, 対照群, 注射後3, 6, 12及び24時間群夫々17.8, 14.6, 17.0, 18.8, 16.1であつて, 肝の本酵素には一定の傾向を認めなかつた。

II. アルギナーゼ

a) 白鼠32匹を対照群8匹, 3時間, 6時間, 12時間及び24時間各々6匹に分け, その肝ホモジエネートのアルギナーゼ活性を測定した。

第1図

家兎血清アルカリフォスファターゼの推移

	No.	体重	前	3	8	24時
対 照 群	1	1.9	4.90	4.85	5.12	4.81
	2	2.1	2.57	2.63	2.42	2.26
	3	2.2	1.34	0.92	0.98	1.06
	4	2.3	1.31	1.57	1.78	1.33
	5	2.2	2.06	1.78	1.76	2.16
	6	2.3	1.24	1.18	1.33	1.18
	平均		2.23	2.14	2.39	2.29
パ ロ チ ン 注 射 群	7	2.2	1.51	1.43	1.34	1.35
	8	1.9	2.83	2.67	2.49	2.18
	9	2.0	3.08	3.37	2.13	1.86
	10	2.0	2.88	2.58	2.48	2.31
	11	1.8	2.06	1.76	1.91	1.58
	12	2.0	0.86	0.95	0.86	0.66
	平均		2.20	2.13	1.87	1.62

結果は第3図の如く, 注射前値は平均110であるのに対し, パロチン注射群では, 3時間, 6時間, 12時間及び24時間群夫々103, 101, 97及び89であつて実測値並びに平均値共に減少して, 24時間で最低に達している。

b) 白鼠56匹を対照群14匹, 3時間及び6時間群各々15匹, 12時間及び24時間群各々6匹に分け

第2図

ラツテ肝アルカリフォスファターゼの変動

	対 照	3	6	12	24時
匹数	14	10	10	10	10
平均	17.8	14.6	17.0	18.8	16.1

第3図 パロチンの白鼠肝アルギナーゼ
に及ぼす影響 (空腹群)

第4図 パロチンの白鼠肝アルギナーゼ
に及ぼす影響 (食餌給与群)

つている。之は Lightbody 及び Kleinman の報告¹⁹⁾の如く、蛋白食投与が肝アルギナーゼ活性を増加させたものと考えられる。

Ⅲ. カテプシン

白鼠39匹を対照群10匹、3時間群9匹、6時間群8匹、12時間及び24時間群各々6匹に分け、その肝ホモジエネートのカテプシン活性を測定した。

結果は第5図の如く対照群平均値は34.3であるが、3時間及び6時間群では夫々40.7、44.2とカテプシン活性が増加し、12時間及び24時間群では夫々31.6、30.5と略々対照群の値に戻っている。

第5図 パロチンのカテプシンに及ぼす影響

第6図 パロチンのトランスアミナーゼ
に及ぼす影響 (予備実験)

ホモジエネート 30mg		50mg	
対 照	パロチン	対 照	パロチン
5.7	7.7	14.6	15.7
6.4	10.7	16.0	16.7
8.7	8.1		16.0
8.0	6.9		
7.8	8.2	15.3	16.1

いづれも絶食を行わずに、その肝アルギナーゼ活性を測定した。

この場合は第4図の如く、注射前値は平均97であるが、3時間及び6時間群の値は夫々107及び113と一時上昇し、12乃至24時間群ではいづれも98と、略々注射前値に戻っている。

第 8 図 パロチンのトランスアミナーゼに及ぼす影響

		Qt	匹 数
肝	対 照 群	95 ± 7	15
	3 時	118 ± 4	16
	6 時	102 ± 8	21
心	対 照 群	112 ± 6	12
	3 時	132 ± 4	17
	6 時	124 ± 4	22

は夫々、118、102と上昇を示し、心臓に於いても対照群平均 112 に対し、3 時間及び 6 時間群平均値は夫々 132、124 と上昇を示している。他の酵素活性が、いづれもパロチン注射後 6 時間或いは 24 時間で最高となつてゐるのに比し、3 時間値が最高値を示しているのは興味深い所見である。

IV. トランスアミナーゼ

トランスアミナーゼは Needham がその存在を示唆²⁰⁾して以来、Szent-Györgyi 等が多くの研究業績を発表している酵素であつて、 α -アミノ酸のアミノ基を α -ケト酸へ転移させる作用を有する。生体内にはアスパラチン・グルタミク・トランスアミナーゼとアラニン・グルタミク・トランスアミナーゼとがあり前者の含量が遙かに多い。白鼠では心筋、骨格筋、脳、肝臓、腎臓、睪丸の順に存在するといわれているので、本実験に於いては、心及び肝についてアスパラチン・グルタミク・トランスアミナーゼのみを測定した。

a) 本実験を行うに先立つてアスパラチン・グルタミク・トランスアミナーゼ活性を、Ames 及び Elvehjem のワールブルグ検圧計による方法²¹⁾で予備実験を行い、第 6 表の如くパロチン注射後 3 時間群が対照群に比し、高い活性を示す傾向を得たが、この方法では一時に多数の試料を測定し得ないので、以後は Tonhazy の方法¹⁷⁾に従つた。即ち第 7 図に示す如く L-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸を基質としてトランスアミナーゼを作用させると、オキサロ酢酸と L-グルタミン酸になる。ワールブルグ検圧計を使用する方法は、生成したオキサロ酢酸にアニリンチトラートを加えて炭酸ガスと焦性葡萄糖に分解し、その炭酸ガス量を測定する方法であり、Tonhazy の方法は焦性葡萄糖を 2, 4-ジニトロフェニルヒドラゼンによつて発色せしめ、之を標準曲線と比較して比色定量する方法である。トランスアミナーゼ活性は之より Qt (臓器乾燥重量当り、単位時間内の炭酸ガス発生モル数) を計算して表わした。

b) 白鼠 54 匹を対照群 15 匹、3 時間群、17 匹、6 時間群、22 匹に分け、その肝及び心を pH 7.4 の磷酸バッファーで 1% ホモジエネートとして、各々のトランスアミナーゼ活性を測定した。

結果は第 8 図の如く、肝臓では対照群平均値が 95 であるのに、注射後 3 時間及び 6 時間群で

考 察

アルカリフォスファターゼは磷酸分解に重要な酵素であり、骨を始めとして広く体内各臓器、分泌液中に存在し、その生理作用は不明の点も少くないが、化骨、腎細尿管、小腸等の糖吸収に関与し、最近では又蛋白合成作用に何等かの関係を有するものと云われている。田中は3例の脊髄性進行性筋萎縮にパロチンを使用して本酵素の増加する事を報じ²⁹⁾、伊藤は家兎に1カ月連続注射を行い逆に低下するとし、一定の傾向が得られていない。本報告に於いては血清のアルカリフォスファターゼは1回注射により低下する事を示しているが、肝臓の酵素活性には変化が認められなかつた。成長ホルモンが血漿アルカリフォスファターゼを増加するという報告¹⁰⁾、或いはテストステロン、アンドロステロンにより去勢白鼠の肝アルカリフォスファターゼが変化しないという報告²⁸⁾と考え合せ今後更に検討を要するものと思う。

アルギナーゼは Krebs-Hensleit のオルニチン・サイクルに関与する酵素であつて、アルギニンを分解しオルニチンと尿素にするもので、動物の肝細胞核に多く存在し、蛋白代謝に於いて異化作用が強い時に活性が高く、发育の盛んな組織では減少するとされている。又蛋白異化的に作用するコルチゾン³⁰⁾を注射する事により、アルギナーゼが増加するとの報告がある³¹⁾本実験に於いても空腹白鼠のアルギナーゼはパロチン注射により減少し、アルギニンの分解が抑制されることがうかがわれ、蛋白代謝は異化よりも同化の方に動いている事を示唆している。又食事を十分に与えた II b) 実験に於いてはアルギナーゼ活性が一時増加しているが、之は前述の説明で良く理解されるものと思う。ACTH により肝アルギナーゼが増加し、成長ホルモンが減少させるという報告²⁴⁾は、本実験と比べ極めて興味深い。

カテプシンは細胞内に存在する酵素であつて、始め動物の死後自家融解を行う酵素として発見されたものであるが、今日では生体内にあつてペプチッドの合成並びに分解を行う酵素として重要視されている。本酵素は I II III 及び IV の四種に分類されその意義が追求されている。本実験に於いてはカテプシン I を主目標として測定し、成長ホルモンと同様に6時間群に増加が見られている事は、パロチンによるペプチッドの合成並びに分解の速度の増加即ち、代謝促進のある事を予想させるものである。

トランスアミナーゼは Braunstein 及び Kritzman によれば 1) グルタミン酸脱水素酵素と共働して酸化的脱アミノ化を行い、2) 或る種のアミノ酸を合成するとされ²⁵⁾、Herbst によれば 3) ペプチド基の合成や、4) 尿素の合成にも関与するばかりでなく、その他多くの中間代謝産物にも関係すると言われている²³⁾ので、他の蛋白代謝に関係する多くのホルモンについても検討が加えられている。即ち Hayano 及び Dorfman は DOCA* 333 γ /cc が白鼠肝臓のトランスアミナーゼを抑制すると報じ²⁷⁾、一方 Dirscherl 等はテストステロン、テストステロン・プロピオネート、デゾキシコルチコステロン及び DOCA は 50 γ /cc in vivo ではいずれもトランスアミナーゼ活性に影響を与えない²⁸⁾としている。又 Eischeid 及び Kochakian はコルチゾンアセテートを毎日1週間以上連続投与すると、肝臓のアスパラチック・グルタミン・トランスアミナーゼは減少するが、心臓及び腎臓のトランスアミナーゼは増加すると云い²⁹⁾、Rindi は白鼠の副腎を摘出すると心臓、筋肉及び脳のグルタミン・アスパラチック・トランスアミナーゼは減少するが、肝臓のトランスアミナーゼには認むべき変化がなく、副腎摘出白鼠にコルチゾンを与えると、心臓及び脳のトランスアミナーゼは正常値に復し、筋肉及び肝臓のトランスアミナーゼは正常値以上に増加する³⁰⁾と報告している。この時又 DOCA を与えると肝臓、心臓及び脳のトランスアミナーゼには影響なく筋肉トランスアミナーゼのみが正常値に復すると言う。正常白鼠にコルチゾンのみを投与すると肝トランスアミナーゼ活性のみが高まり、DOCA にはこの作用がないと言う。Awapara によれば去勢は白鼠摂護腺前葉のグルタミン・アラニン・トランスアミナーゼ活性を抑制するが、この場合テストステロン・プロピオネートを投与すれば、その活性が回復するという³¹⁾。Kochakian 等によれば、成熟白鼠の甲状腺を摘出すると、肝臓重量当りのトランスアミナーゼ活性には変化がないが、肝臓重量の減少に伴つて、トランスアミナーゼの全量は減少するという³²⁾。この場合テストステロンの投与は酵素活性に変化を与えていない。去勢白鼠では心臓及び腎臓の重量

* Desoxycorticosterone Acetate

が減少し、之に伴つてトランスアミナーゼ全量が減少するが、この際はテストステロン投与が、減少した酵素を回復させるという。

パロチン注射後カテプシン、アルギナーゼ、アルカリフォスファターゼ等の他の酵素群が6時間でその活性が最高又は最低となるのに、独りトランスアミナーゼのみが3時間で最高の活性を示す理由については、生体内の中間代謝の機序は複雑であるから、外部から簡単に予断する事は出来ないが、以下推測を試みてみよう。高岡、山口、石川は血清蛋白、残余窒素、アミノ窒素もパロチン注射後6時間で最低となる事を報じている。一方著者はパロチン注射後白鼠肝ホモジェネートの TCA* 回路の回転が、3~6時間目に最も促進される事を報告し³⁰⁾て居り、生体はパロチン注射により上記実験成績の如く各種酵素系の活性を増し、之が更に TCA 回路の回転促進と、酵素系増加とを順次に起すものと思われる。トランスアミナーゼは之等の変化に先だつて活性が高まり、血清中の窒素を利用し得る形のアミノ基とし、一方アミノ基を失つた諸有機物、或いはアミノ基転移によつて新たに生じたアミノ酸を、蛋白合成や、TCA 回起に利用され易くするものと考えられる。

以上の結果を、窒素蓄積作用、成長促進作用がパロチンと同様である成長ホルモンと、総括比較検討してみると、アルギナーゼについては両者が同様の作用を示すが、カテプシン及びトランスアミナーゼ活性増加作用はパロチンが強く、肝アルカリフォスファターゼに対しては、成長ホルモンは増強しているが、パロチンは一定の傾向を示さない。成長ホルモンは肝カタラーゼ活性を減少させるが、教室加藤(博)の実験によると³⁴⁾、パロチンは之を増強させるのである。尚パロチンは心筋トランスアミナーゼ活性をも増強する事は、最近心筋梗塞症の際血清トランスアミナーゼが増加するという諸家の報告³⁵⁾と考え合わせて興味ある事実である。

一方臨床的応用に当つて成長ホルモンが強い Diabetogenic action を有するに反して、パロチンが全くこの作用を有しない事は、非常に有利な点であると考え。更にパロチンは成長ホルモンが有しないグルタミン・アスパラチン・トランスアミナーゼ活性促進作用を有する事は、パロチンが或る方面では成長ホルモンより更に強力な作用を示すものと思われる。

結 論

パロチンの諸酵素系へ及ぼす影響について、主として白鼠を用いて実験を行い、パロチンは 1) 血清アルカリフォスファターゼ活性を減弱させる傾向を有するが、肝のそれには影響を認め難く、2) 肝アルギナーゼ活性を減弱させ、3) 肝カテプシン活性を増加させ、4) 肝及び心トランスアミナーゼ活性を共に増強した。

以上の結果を蛋白代謝に関するホルモンである成長ホルモンと比較検討し、パロチンの蛋白蓄積作用及び成長促進作用と合わせ考えて、パロチンが蛋白合成に関与する事を強く示唆する成績を得た。

執筆するに当り、御指導、御校閲を戴いた恩師沖中教授に深謝すると共に、終始御指導、御協力を頂いた高岡講師を始め、教室山田、山口両博士、石川学士、鈴木康夫氏に厚く感謝する。

文 献

- 1) Y. Takaoka et al.: Klin. Wschr. 32 (15): 369, 1954.
- 2) Y. Takaoka et al.: Ibid. 33 (15): 156.
- 3) 山口時三: ホルモンと臨床, 2巻4号, 1022頁, 1954.
- 4) 石川俊之: 日本内分泌学会雑誌(発表予定)
- 5) 守一雄他: ホルモンと臨床, 3巻9号, 1017頁, 1954.
- 6) 田坂定孝他: 綜合臨床増刊, 唾液腺ホルモンと臨床, 127頁, 1955
- 7) 佐々木哲丸他: 同誌172頁.
- 8) 角尾: 28年度文部省総合研究報告集録(医学及び薬学) 唾液腺ホルモンに関する研究, 班長緒方知三郎

* Tricarboxylic acid

- P 269. 9) Recent Progress in Hormone Research Vol. III. 1948. 10) Beaton, G.H. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83 : 781, 1953. 11) Bartlett, P.D. & Glynn, M. : J.B.C. 187 : 261, 1950. 12) Mathies, J.C., Palm, L. & Gaebler, O.H. : Endocrinol. 45 : 480, 1949. 13) Gaebler, O.H. & Mathies, J.C. : Ibid. 48 : 623, 1951. 14) 崎田隆夫 : 日本消化機病学会雑誌, 50 (11) : 1昭28. 15) Van Slyke, D.D. & Archibald, R.M. : J.B.C. 165 : 293, 1946. 16) Miller, L.L. : J.B.C. 152 : 603, 1944. 17) Tonhazy, N.E., White, N.G. & Umbreit, W.W. : Arch. Biochem. 28 : 56, 1950. 18) Bodansky, A. : J.B.C. 101 : 93, 1933. 19) Lightbody, H.D. & Kleinman, A. : J.B.C. 129 : 71, 1939. 20) Needham, D.M. : Biochem. J. 24 : 208, 1930. 21) Ames, S.R. & Elvehjem, C.V. : J.B.C. 166 : 81. 22) 田中剛二他 : 第70回内科学会関東地方会, 昭29年. 23) Kochakian, C.D. & Steffner, C.E. : Am. J. Physiol. 155 : 255, 1948. 24) Fraenkel-Conrat, H., Simpson, M.E. & Evans, H.M. : J.B.C. 147 : 99, 1942. 25) Braunstein, A.E. & Kritzmman, M.G. : Enzymologia 2 : 129, 1936. 26) Herbst, R.M. : Advances in Enzymology 4 : 75, 1944. 27) Hayano, M. & Dorfman, R.I. : Ann. N.Y. Acad. Sci. 54 : 608, 1951. 28) Dirscherl, W. : Biochem. Zschr. 323 : 399, 1953. 29) Eischeid, A.M. & Kochakian, C.D. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85 : 339, 1954. 30) Rindi, G. : Arch. Sci. Biol. 38 : 155, 1954. 31) Awapara, J. : Endocrinology 51 : 75, 1952. 32) Kochakian, C.D., Reed, B.A. & Eischeid, A.M. : Am. J. Physiol. 177 : 413, 1952. 33) 湯浅恭一他 : 内分泌 2 卷 1 号, 10頁, 昭30. 34) 加藤博 : Zschr. f. ges. exp. Med. 127 : 203, 1956. 35) Karmen, A., Wroblewski, F. & Ladue, J.S. : Circulation 11 : 871, 1955. Kattus jr., A.A., Watanabe et al. : J.A.M.A. : 160 (1) : 16, 1956. 36) Cannon, P.R., Frazier, L.E. & Hughes, R.H. : Arch. Path. 61 (4) : 271, 1956. 37) 小田正幸 : 日本臨床, 14卷 2 号, 45頁, 昭31.

パロチンの新陳代謝に及ぼす影響

(Ⅱ) パロチンの P/O 比に及ぼす影響

東京大学冲中内科

湯 浅 恭 一

緒 言

パロチンが緒方教授の提唱した骨塩代謝に関与するのみならず、蛋白代謝にも影響を与えると云う高岡の説は、その後山口、石川³⁾等により証明され、蛋白代謝の中でも特に合成面に働く事が報告された。著者もその一部として、第1報に於いてパロチンの諸酵素に及ぼす影響を実験し、この説を肯定する結果を得た。

一方臨床的に高岡、宇尾野はパロチンを注射された重症筋無力症患者の血清中エステル型ビタミン B₁ が増加する事を報告したが¹⁾、この事実はパロチンがビタミン B₁ の磷酸化に (Phosphorylation) 関与する事を示している。ビタミン B₁ がエステル型に変化する為には、ATP* の磷酸基が分離してビタミン B₁ に結合し、ATP 自身は ADP** になると考えられる。

したがってパロチンの注射がビタミン B₁ のエステル型を増加させる事は、パロチンが ATP の代謝に関与する事を予想させる事実である。ATP によつて代表される高エネルギー磷酸化合物は蛋白合成を含めて各種生体内の動力源として、エネルギー代謝面に重要な位置を占め、磷酸化に関与する事は、近年明らかにされた甚だ興味ある問題である。ATP 自身は溶液の形では極めて不安定であり、合成されると同時に分解も起つていたので、ATP を直接測定する方法は、現在では極めて困難である。従つて著者等はパロチンの TCA 回路に及ぼす影響を研究して、パロチン注射が白鼠肝ホモジェネートの酸素吸収を増加させることから、パロチンが ATP を増加させる事を推論した²⁾。しかし酸素吸収の増加のみから ATP の増加を断定する事は、危険な場合もあり得るので、今回はより直接的にこれを証明する為に、現在最も信頼し得る方法とされている P/O 比を測定した。

P/O 比とは酸化的磷酸化 Oxidative phosphorylation、或いは磷酸化に共軛せる酸化 Oxidation Coupled with Phosphorylation とも言われ、基質が TCA サイクル等によつて酸化されて、酸素一分子が吸収される時に生成される ATP のモル数を表わすものである。例えば α -ケトグルタル酸を基質として肝ホモジェネートに加えると、之が一分子の酸素を吸収して炭酸ガスと水とに分解する際に、無機磷が吸収され之が ADP と結合して ATP となる。この時吸収される無機磷と、吸収された酸素との比を測定するのである。同時に生じた ATP はクレアチン或いはブドウ糖+ヘキソキナーゼによつて、安定なクレアチン磷酸或いはブドウ糖 6 磷酸に高エネルギー磷酸結合基を与えて ADP となる為、反応が円滑に進行するのである。(第1図参照)。この場合 ATP-ADP 系は磷酸基をその受容者へ運ぶ触媒の如く作用する。P/O 比の測定はある程度熟練すれば比較的正確且容易に行える方法であり、パロチン注射が P/O 比を高める時は、パロチンが生体内で ATP を増産する事になり、パロチンの作用機転を解明するのに有用と考えられるので、パロチン注射後の白鼠肝ホモジェネートについて P/O 比の測定を行い、興味ある結果を得たので報告する。

予 備 実 験

体重100g 前後の雄性白鼠6匹を選び、約18時間空腹とし、之等を2群に分けて、一群にはパロチンの溶媒である0.6%食塩水を注射して対照とし、他群にはパロチン体重毎²3 厩を腹腔内に注射し、両群共注射後6時間で断頭開腹し直に肝臓を取出し、トルジオンバランスで約500mg を秤量した。この肝臓を予め氷

*アデノシン三磷酸 **アデノシン二磷酸

冷しておいた Potter-Elvehjem のホモジェナイザーに入れ、4容の等張氷冷塩化カリ・磷酸バッファー(10容の0.9%塩化カリ溶液と1容の M/10 第二磷酸カリ溶液を混じたもの)を用い、氷冷しつつ均等化し、このホモジェネートを酵素液としてその P/O 比を測定した。注射後6時間で白鼠を殺したのは先に報告した TCA 回路による酸素吸収が、6時間群に於いて最も高かつたりからで、基質としては α -ケトグルタル酸 (California Foundation for Biochemical Research 製品)を用いた。

P/O 比の測定は先ず第1表の処方のように、クレアチンを用いる方法³⁾で行ったが、緒方等によればチトクローム C 及び DPN* の添加は P/O 比に影響しない⁴⁾ので、之等を加えずに実験を行った。各溶液はいずれも予め pH を7.4に合わせた。ワールブルグ検圧計フラスコは一つの試料につき2コづつ用い、気相は空気、摂氏30度で空振り5分後、一コは直ちに側室内の5%三塩化醋酸を混じて反応を中止し、無機磷を測定、他の一コは3分毎に6分間酸素吸収を測定した後、同様に反応を中止して無機磷を測定しこの二者の差から減少無機磷のモル数を計算した。無機磷の測定は Lowry-Lopez の方法⁵⁾により発色せしめ、日立製ベックマン型分光光電比色計(波長700m μ)を用いた。

第1表

主 室	肝ホモジェネート	0.3cc
	M/10 α -ケトグルタル酸	0.3 "
	M/100フマル酸	0.2 "
	M/50 ATP	0.2 "
	M/10磷酸バッファー	0.2 "
	M/2 KCl	0.2 "
	M/10 MgCl ₂	0.1 "
	M/4 NaF	0.2 "
	クレアチン	300mg
	再蒸溜水	0.8cc
副室……10% KOH		0.2 "
側室……5%トリクロール醋酸		0.3 "

第2表

	酸 素 吸 収 μ atoms	無機磷減少 μ moles	P / O	
パロチン群 No. 30	1.52	1.65	1.08	
	No. 33	1.95	2.00	1.03
	No. 38	1.35	1.37	0.99
平 均	1.61	1.67	1.05	
対 照 群 No. 29	1.16	0.59	0.51	
	No. 32	1.82	0.86	0.47
	No. 51	1.32	0.68	0.52
平 均	1.43	0.71	0.50	

結果は第2表の如く、パロチン群は平均1.05、対照群は平均0.50で、パロチン群の P/O 比は対照群の略々2倍の値を示し、酸素吸収も多い。P/O 比が理論値(3~3.2)よりも低いのはミトコンドリアを分離せずにホモジェネートを用いた為ではないかと思われる。之でパロチン注射が白鼠肝臓ホモジェネートの酵素系による P/O 比を高める見通しを得た。

本 実 験

予備実験で生成されるクレアチン磷酸は少々不安定であり、測定の際の実験操作にも熟練を要するので、本実験にはより確実で、反

ネー図

* Diphospho Pyridine Nucleotide

応生成物がより安定であるヘキソキナーゼ法⁶⁾を採用した。第1図の様に ATPの $\sim P^*$ をヘキソキナーゼ及びブドウ糖の共存の下で、ブドウ糖6 磷酸に移行させる方法である。基質は予備実験と同様の α -ケトグルタル酸を用いた。処方⁷⁾は第3表の通りである。チトクロームCは Nutritional Biochemical Corp. 製品、ヘキソキナーゼは同社製結晶及び一部 Meyerhof 氏法⁷⁾により日東食品製イーストより自製の粗結晶を用いた。白鼠は予備実験と同様の条件で、11匹をパロチン群6匹、対照群5匹に分け、その肝臓の33%ホモジェネートを酵素液として実験に用いた。ワールブルグフラスコは1つの試料について4コづつ用い、気相は空気、摂氏35度で5分間空振りの後、2コは側室の87.5% (W/V)**の3 塩化醋酸を混じて直ちに反応を止め無機磷測定⁸⁾の対照とし、残りの2コは5分毎に10分間酸素吸収を測定後、同様に反応を止めて無機磷の減少を計測した。

第3表

	肝ホモジェネート	0.5cc
	0.015 M ATP	0.2
	0.01 M MgSO ₄	0.2
	0.3 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	0.2
主室	.15 M アルファケトグルタル酸	0.2
	0.4 M ブドウ糖	0.2
	5×10^{-4} M チトクロームC	0.2
	0.25 M KCl	0.2
	10mg/ml ヘキソキナーゼ	0.2
	0.2 M NaF	0.2
副室	10% KOH	0.2
側室	87.5% W/V トリクロール醋酸	0.5

結果は第4表の如く、パロチン群 P/O 比 平均値1.68, 対照群平均値1.12と、パロチン注射群は対照群に比し、個々の値も平均値も著明に多く、推計学を用いる迄もない。酸素吸収、無機磷減少値が、予備実験に比し多いのは、反応温度が異なる為と、測定法の差によるものであり、P/O 比が予備実験に比し高いのは、クレアチン磷酸よりもブドウ糖6 磷酸がより安定であり、反応進行がより円滑となる為であろう。予備実験で予想した如く、本実験に於いても、パロチン注射が白鼠肝臓に於いて ATP 生産を増強する結果を得た。

第4表

	酸素吸収 μ atoms	無機磷減少 μ moles	P/O
パロチン群			
No. 60	10.6	17.8	1.69
No. 61	7.3	10.6	1.46
No. 63	7.0	10.0	1.44
No. 70	8.2	13.8	1.68
No. 78	7.5	14.3	1.91
No. 81	5.3	10.4	1.95
平 均	7.65	12.8	1.68
対 照 群			
No. 76	6.9	5.9	0.85
No. 72	8.5	9.4	1.16
No. 74	7.2	9.5	1.32
No. 80	6.5	7.7	1.18
No. 79	3.9	4.2	1.08
平 均	6.60	7.3	1.12

* 高エネルギー磷酸結合

**Weight/Volume

考 察

生体内で行われる種々の仕事、殊に合成反応の関与する仕事に要する エネルギーは、ATP 等の高エネルギー磷酸結合によつて供給されると云う考えが、今日生化学の分野に於いては最も支配的である。しかもその ATP の供給源は、糖分解、特に TCA 回路に於いて一分子の焦性ブドウ酸が分解する際に15~16個の ATP が生産されることによる。かくして生じた ATP が生体内代謝過程に於いて占める重要な役割については、前述の如く膨大な文献が生化学方面にあるのでここでは省略するが、近年 ATP を薬剤として投与した場合、之が生体に極めて広範囲影に響を与える事が注目されて来ている。即ち1929年 Drury 及び Szent-Györgyi が ATP の循環系に対する効果を報告した事に始まり Bennett 及び

Drury⁸⁾, Somner⁹⁾, Herbrand¹¹⁾, Köbcke¹¹⁾, Dubois-Ferrière¹²⁾ 等が何れもアデニル酸, AMP, ADP, ATP 等を心疾患を始め多くの疾患に投与して, 血管拡張作用, 循環血液量の増加を認めた他, 狭心症心筋梗塞, 高血圧等に臨床的に有効であると報じている. 1953年 Winbury 等は犬の冠循環血流量をロタメーターで測定し, 之を増加させる力は ATP を100とすれば, ADP 95, AMP 28, イースト AMP 約10, アデノシン25の割合であつて, アデニン及びクレアチン磷酸には冠循環血流量増加作用を認めなかつた¹³⁾と報告している. 又 Müller は31例の偏頭痛患者に ATP を投与してその25例に著効を認め¹⁴⁾, Barker はアデノシン及び A-MP が間歇性跛行症に著効がある¹⁵⁾と報じている.

一方パロチンについては, 金子は間歇性跛行症の症状を改善し, 心臓性喘息, 心筋梗塞にも効果がある¹⁶⁾と報告している. 参木¹⁶⁾及び馬詰²⁾はパロチン使用が網膜中心動脈の最低血圧を降下させると報告し, 高岡はレイノー氏病にパロチンの効果を認め, 更に心電図上 ST の著明な低下を伴つた狭心症が, パロチン使用により心電図の正常化と症状の改善を来した例を報告している¹⁷⁾. 金子山田等は高血圧及び脳出血後遺症にパロチンの効果を認める等¹⁸⁾, 何れもパロチンにも血管拡張作用並びに循環血液量の増加作用がある事を示唆している.

1) ウマチに対しては Carlström 及び Lövgren は ATP を投与するとその症状及び血沈値が改善されると報告¹⁹⁾, Dubois-Ferrière 他の古典的療法が無効であつた患者に ATP 注射を行い, その60~80%に運動機能の回復と症状の改善を認めている¹²⁾. 彼は ATP がリウマチに効く理由は単なる血管拡張作用のみならず, 磷酸化を強める事によつて生物学的触媒 Catalyseurs Biologiques の欠乏を改善する事にあるのではないかと考察している. 一方田坂が亜急性リウマチ患者10例の全例に^{19a)}, 河合^{19b)}, 佐々木^{19c)}等も本疾患の一部症状にパロチンの効果を認めているが, この事も ATP のリウマチ疾患に対する効果と考え合せて興味深いと思われる.

Kleinsorge 及び Schuchardt²⁰⁾, Nissen²¹⁾ は ATP が糖尿病に対して有効であるのは, ヘキソキナーゼ活性を刺戟して肝グリコーゲンを増加させる為であろうと報告し, Kleinsorge 等は健康人36例に ATP を投与した場合にも, その32例に血糖降下を認めている. 為田はパロチンも正常犬の血糖を低下させる²²⁾と報告している.

Feldman はビタミンE欠乏による家兎の筋萎縮症の進行を ATP が阻止した²³⁾と報告し, Lehoczy は多発性硬化症患者55例にビタミン B₁ と ATP を同時に投与した所, その31例に軽快を認め²⁴⁾, Dubois-Ferrière もその歩行失調症, 筋緊張昂進等に好結果を得ているが, パロチンに於いても高岡等はクレアチンの尿中排泄が抑制され, クレアチン尿を有する筋疾患にパロチンが有効な事を認めている. ビタミンB₁, 代謝に於いてパロチン注射がそのエステル型を増加させる事は前述の通りである²⁾. 臨床的に ATP とパロチンの効果が以上の如く類似している点は極めて興味深い.

次に他のホルモンの P/O 比に及ぼす影響を文献的に見ると, その多くは in vitro の影響が研究されている為, 今回私が行つた in vivo の実験成績とを直ち比較検討する事は出来ないが, 簡単に列挙すると次の如くである.

1) 甲状腺ホルモン Maley 及び Lardy によれば, 甲状腺ホルモン及びサイロキシンを in vitro に加えた白鼠の肝臓では, P/O 比が対照よりも低下している²⁵⁾. Lardy 及び Maley によるとサイロキシンは in vitro で 10^{-8} M の濃度で, グルタミン酸を基質にした時の白鼠腎臓の P/O 比を低下させるが, β -ヒドロキシブチレート及びカプリル酸を基質にした時には, P/O 比を低下させない²⁶⁾と報告している.

2) インシュリン Smith 等によれば, インシュリンは in vitro でアロキサン糖尿病白鼠の肝ホモジェネートのビタミン B₁エステル型を増加させる²⁷⁾, 即ち磷酸化を高めるとされ, Haugaard 等により, インシュリンはブドウ糖存在の下に於いて, ATP 及びクレアチン磷酸を消費して, 磷酸エステルの形成を助ける²⁸⁾と報告されている. Polis は0.8ccの肝ホモジェネートに0.02~0.2単位のインシュリンを in vitro で加えると, 僅かではあるが推計学的に有意な P/O 比増加が起る為, インシュリンは少く共 TCA サイクルに促進的に作用する²⁹⁾と述べている.

3) コルチゾン 比較的以前より、臨床応用の際に合計1瓦の使用により炭水化物代謝が障害されたとの報告があり³⁰⁾、最近では Cortisone Diabetes が問題にされている。コルチゾンを注射された白鼠の骨格筋のクレアチン磷酸及び ATP の含量には変化がなかったという報告³¹⁾もある。Bacilla はコルチゾンはヘキソキナーゼの SH 基に結合して P/O 比を抑制するのであろう³²⁾と述べている。

4) 性ホルモン 蛋白同化作用がある MAD* は臨床的使用の際 ACTH の蛋白分解作用に拮抗するが³⁴⁾エストロゲン系の化合物は $10^{-4}M$ の濃度で、in vitro 及び肝切片 (Slice) に添加した時にコハク酸酸化酵素を80%抑制するといわれている。又デエチルステロイドはマロン酸よりも強い阻害作用を示し、白鼠肝切片のコハク酸酸化酵素を抑制している³⁵⁾。

5) 成長ホルモン 成長ホルモンは TCA 回路の一員であるコハク酸酸化酵素には、特異的な働きは証明されていない³⁶⁾。

即ち現在迄知られているホルモンについて得られた成績は、実験条件、測定対象が異なる為、各々を直接比較する事は出来ないが、少く共蛋白合成的に働くといわれているインシュリンでは P/O 比が上昇し、蛋白分解的に働くといわれているサイロキシンには P/O 比抑制的な作用がある事から考えると、パロチンの

P/O 比上昇作用の意義が明確になると思われる。さらに ATP が第2図の如く、広くペプチド基の結合に用いられる³⁷⁾ばかりでなく、自由アミノ基からのペプチド合成の唯一の場合であるグルタチオンの合成にも必要であり³⁸⁾、前述のトランスアミナーゼが第3図の如く酸化的磷酸化と密接な関係にある³⁹⁾事を考えれば、パロチン注射による P/O 比の上昇即ち ATP の増加は之等ペプチドの合成にも好影響を示す事になる。この事はパロチンがトランスアミナーゼ活性や、 C^{14} -グリシンの肝蛋白への取入れを増加させる事と良く一致し、石川が指摘した如くパロチンが蛋白合成と密接な関係を有する事を肯定させるものである。Cantarow が ATP は C^{14} -アラニンのミトコンドリア蛋白への取入れを増す⁴⁰⁾と報告している如く、蛋白合成と ATP とは不可分の関係にあり、パロチンによる蛋白合成作用³³⁾も ATP の増産なくしては考えられ

ない。臨床的に水溶性ビタミンを単独に使用して無効な場合、パロチンの併用が望ましい事も ATP の関係から理解されるが、この事は教室入江等の Behcet 症候群に対するパロチンの使用⁴¹⁾によつて、立証されている。最近佐瀬⁴²⁾は雄性ハムスターの肝ミトコンドリアを用いてパロチンが酸化的磷酸化を促進すると報告している。

結 論

白鼠にパロチンを注射し6時間後に屠殺した際の肝ホモジェネートの P/O 比は、対照群に比し増加する事を認めたので、パロチンの注射が肝の ATP を増加させるものと考ええる。

パロチンの作用機序とその臨床的応用について ATP の生理的作用の面から若干の考察を加えた。

(予備実験の成績の一部は第27回日本生化学会総会に於て報告した)

* Methylandrostenediol

擧筆するに当り、終始御指導、御鞭達を戴いた恩師冲中教授、高岡講師、本実験の遂行に当り御指導、御援助を頂いた教室山田博士、二宮博士、石川学士、本学農学部農芸化学教室中村助教授に深謝する。

文 献

- 1) 高岡善人, 宇尾野公義: 診療 7 卷 9 号, 65 頁, 昭 29 年; Klin. Wschr. 33 (15): 156, 1955.
- 2) 湯浅恭一他: 内分泌 2 卷 1 号 10 頁, 昭 30 年.
- 3) Ochoa, S.: J.B.C. 151: 493, 1945.
- 4) Ogata, K. & Hashimoto, S.: J. Biochem. 39 (1) 1952.
- 5) Lowry, O.H. & Lopez, J.A.: J.B.C. 162: 421, 1946.
- 6) Lardy, H.A. & Wellman, H.: J.B.C. 195: 215, 1952.
- 7) Meyerhof, O.: Biochem. Zschr. 183: 176, 1927.
- 8) Bennett, D.W. & Drury, A.N.: J. Physiol. 72: 288, 1931.
- 9) Somner, W.: Münch. med. Wschr.: 82 (8): 292, 1935.
- 10) Herbrand, W.: Dtsch. med. Wschr. 63 (49): 1841, 1937.
- 11) Köbcke, H.: Dtsch. med. Wschr. 45: 1668, 1939.
- 12) Dubois-Ferriere, H.: Helv. med. acta 18: 84, 1951.
- 13) Winbury, M.M. et al.: J. Pharm. Exptl. Therap. 109: 255, 1953.
- 14) Barker, N.W., Brown, G.E. & Roth, G.W.: Am. J. Med. Sci. 189: 36, 1935.
- 15) 金子義晃: 綜合臨床 唾液腺ホルモンと臨床 増刊, 144 頁, 昭 30 年.
- 16) 参木綿司: 文部省科学研究報告, 287 頁, 昭 28 年.
- 17) 高岡善人: 綜合臨床 4 卷 4 号 535 頁, 昭 30 年.
- 18) 山田弘三他: 綜合臨床<唾液腺ホルモンと臨床>増刊, 154 頁, 昭 30 年.
- 19) Carlström, B. & Lövgren, O.: Acta med. Scand. 115: 568, 1943.
- 19a) 田坂定孝: 昭 28 年文部省報告 286 頁.
- 19b) 河合直次他: 綜合臨床, 増刊 165 頁, 昭 30 年, 2 月.
- 19c) 佐々木哲丸他: 同書 172 頁.
- 20) Kleinsorge, H. u. Schuchardt, H.: Münch. med. Wschr. 1954 (9).
- 21) Nissen, K.: Dtsch. med. Wschr. 77: 1484, 1952.
- 22) 爲田: 日本内分泌学会雑誌 27 卷 1~10 号, 昭 27 年.
- 23) Feldman, D.L. & Grigor'eva, V.A.: Ukrain. Biokhim. Zhur. 22: 41, 1950.
- 24) von Lehoczy, T.: Mschr. Psychol. 109: 141, 1944.
- 25) Maley, G.F. & Lardy, H.A.: J.B.C. 204: 435, 1953.
- 26) Lardy, H.A. & Maley, G.F.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 54: 636, 1951.
- 27) Smith, F.W.: Arch. Biochem. & Biophys. 40 (2): 323, 1952.
- 28) Haugaard, N., Marsch, J.B. & Stadie, W.C.: J.B.C. 189: 59, 1951.
- 29) Polis, H.D. et al.: Arch. Biochem. 23: 505, 1949.
- 30) Coste, F. et al.: Presse méd. 59: 1565, 1951.
- 31) Albaum, H.G., Tonhazy, N.E. & Umbreit, W.W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76: 546, 1951.
- 32) Bacila, M. & E. Barron, S.G.: Endocrinol. 54: 591, 1954.
- 33) 石川俊之: 日本内分泌学会雑誌 (発表予定).
- 34) Homburger, F. et al.: J. Clin. Endocrin. & Metab. 13: 704, 1953.
- 35) Meyer, B.K. & Mcshan, W.H.: Recent Progr. in Hormone Res. 5: 465, 1950.
- 36) Gaebler, O.H., Mathies, J.C. & Palm, L.: Endocrinology 45: 267, 1949.
- 37) Cohen, P.P.: The Enzyme, Vol. 1. Part 2 1040P, 1951.
- 38) Block, K., Snoke, J.E. & Yanari, S.: Phosphorous Metabolism 2: 82, 1952.
- 39) Rattner, S.: Ibid. 1: 601, 1952.
- 40) Cantarow, A. et al.: Cancer Research 14: 115, 1954.
- 41) Müller, G.M.: Münch. med. Wschr. 1953: 273.
- 42) 馬詰嘉吉: 文部省科学研究報告, 288 頁, 昭和 28 年.
- 43) 入江実, 他: 診断と治療 44 卷 8 号 842 頁, 昭 31.
- 44) 佐瀬民雄: 唾液腺ホルモンシンポジウム (昭和 31 年 11 月 14 日) で口述