特集 巨赤芽球性貧血

ビ タ ミ ン B_{12} , 葉 酸 の 代 謝

奥 田 邦 雄**

ビ タ ミ ン B_{12}

B_{12} 補酵素はコリン核の中央にある 3 価の Co 原子の上方に 5'-deoxyadenosine が配位しているが, Co 原子の上方に CN が配位しているのが従来 B_{12} と呼ばれていた cyanocobalamin である. 生体にはその他上方配位子が OH (または OH_2) の hydroxocobalamin および CH_3 の methylcobalamin がある.

B_{12} の体内における代謝, その吸収は, B_{12} の発見当時, 特殊な性格をもっているということで興味もたれた. すなわち Minot と Murphy が悪性貧血の肝療法を発見してノーベル賞をうけ, Castle が内因子・外因子の二つの造血因子を想定し, その後外因子が B_{12} と同定され, 内因子は胃から産生されるムコ蛋白で特殊な作用をもって B_{12} の吸収に関与することが判明したことは周知のところである.

内因子の精製はブタの胃が悪性貧血に有効であるということから主としてブタの胃粘膜を材料として多くの研究者によって試みられ, また一方ヒトの内因子も Gräsbeck¹⁾ により精製され, それぞれ精製に成功している. 内因子は糖を含んだ蛋白で分子量は約 60,000 ぐらいと推定されている.

B_{12} 吸収の部位, 測定法

B_{12} 吸収測定法: B_{12} の構造中コリン核中央の Co 原子は安定で Co 標識の B_{12} が吸収測定

に用いられる. 生理的な B_{12} の経口負荷量として通常 0.5~2.0 γ の量が用いられる. 吸収絶対量は便中非吸収分から逆算するのが理論上正確であるが, いったん吸収されたものの一部はまた便中にでてくる. Schilling 法は経口投与 2 時間後に非放射性 B_{12} を大量 (1,000 γ) 皮下注射して吸収された B_{12} を尿中に流をす方法で施行が容易なので広く用いられる. その場合吸収量の $1/3 \sim 1/4$ ぐらいが 24 時間尿中にでくると考えられる. B_{12} の主吸収部位は, ヒトでは小腸下部と考えられており, 空腸からはほとんど吸収されない²⁾.

吸収の機構と量の関係

食品に含まれる B_{12} の量は 1 日 1~5 μg ぐらいで, したがって 1 回に胃から腸に下降する B_{12} の量はきわめて少量である. すなわち 1 回に 0.5~2 μg を投与する吸収試験の場合と食物からの B_{12} の遊離とはかなり異なり, 後者の場合のほうが吸収能率ははるかによい. この範囲の B_{12} 量の吸収には内因子の介助が必要であり, 内因子が欠乏する悪性貧血, 無胃性貧血などで B_{12} 欠乏がおこるのはこの生理的な B_{12} 吸収が内因子を必要としているからである. 経口投与量が増えるにつれて吸収率は低下する (図 1). しかし大量の B_{12} を与えた場合は内因子なしで吸収がおこる. すなわち内因子を完全に欠除する胃全摘患者に大量の B_{12} を経口投与すると一過性に著明な血中 B_{12} 濃度上昇をみる. いいかえると B_{12} の吸収には内因子を必要とする吸収としからざる吸収と 2 種の機構があるということになる. 内因子がいかなる機序で生理的な B_{12} の吸収を介助するかは長年の興味の中で

* Metabolism of Vit. B_{12} and Folate

** 千葉大学医学部第一内科

Kunio Okuda: The First Dept. of Internal medicine, Faculty of medicine, Chiba University.

図1 経口投与 B_{12} 量と吸収(尿中排泄)量との関係(Schilling 法による)。

あり、まだ十分わかっていないが、現時点においては次のように考えられている。

(1) B_{12} が消化により食品から遊離すると、あるいは遊離型の B_{12} を与えるとそれは内因子とまず結合して内因子・ B_{12} 複合体をつくる。この現象は試験管内で放射性 B_{12} を用いて容易に証明される。すなわち内因子源と B_{12} を合わせると直ちに B_{12} は非透析性になる。この内因子と B_{12} の結合は胃の中でおこると一般に考えられていたが、筆者らの研究により、それは胃内のみならず小腸内でも、胃から下降してきた内因子と小腸内で遊離する B_{12} とが結合することが明らかとなった³⁾。

(2) この複合体がおもに Ca^{2+} 、一部 Mg^{2+} イオンを介して小腸粘膜(ヒトではおもに回腸)の表面にある受容体 receptor に吸着される。この反応はキレート剤を用いることにより容易に阻害される。この受容体の生化学的性質はまだ明らかでない。

(3) 粘膜表面に吸着された内因子・ B_{12} 複合体のその後の運命に関していろいろな説がある。 B_{12} が再び遊離して吸収されるという考え、複合体そのままが pinocytosis で粘膜内にはいるという考え⁴⁾、また内因子の一部が B_{12} という複合体にはいるという考えの三つである。

なぜ内因子のような物質の介助が必要であるかという点は明らかでないが、食品中の B_{12} の濃度が低く、その量が極端に少ないので、消化管内では細菌にとられたり、また腸粘膜表面やそれから遊離して管腔内にある非内因子性 B_{12}

図2 少量および大量の $^{57}Co-B_{12}$ を経口のならびに経直腸的に与えたときの吸収(Schilling 法)

結合物質と結合して不活化されたりすることに対抗して、内因子がわずかな数の B_{12} 分子を能率よく粘膜内に入れるための合目的な、また必要な手段であるとも考えられる。

非生理的な大量の B_{12} を与えた場合の吸収についてはおもに物理的機序すなわち受動的な濃度勾配による拡散浸透のような機構が推定されている。生理的と大量の中間量たとえば $10 \sim 100 \mu g$ くらいの場合には内因子介助によるものと物理的な機構の両方が働くものと考えられる。ヒトに $1,000 \mu g$ を与えるとその吸収率は約1%($10 \mu g$)前後でそれより量を増せば吸収率は若干減ずるが吸収絶対量はふえる。すなわち悪性貧血や無胃性貧血は内因子なしでもこのくらいの量を与えて十分臨床的な治療効果が得られる。なおこのような大量を与えると消化管粘膜のみでなく、呼吸器粘膜からでも吸収されるし、また直腸粘膜からも高濃度では吸収がおこる⁵⁾(図2)。

ビタミン B_{12} の排泄

放射性 B_{12} をシロネズミに注射して放射能の排泄をみると投与量が多いほど直ちに尿中に出る部分が多い。たとえば $CN-B_{12} 1,000 \mu g$ をヒトに注射すると初めの24時間にその大部分は尿中に失われる。 $CN-B_{12}$ に比べ $OH-B_{12}$ は組

図 3 $^{57}\text{Co-B}_{12}$ をシロネズミに経皮的に投与した後の全身放射能の減少と便中への放射能の排泄。

組織親和性が大きく、注射部位から血中への移行が遅れ、また血中でタンパク質と結合する量が大きいので尿中のロス是比较的少ない⁶⁾。DBCC はほぼ OH-B_{12} に類似であるが $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ は CN-B_{12} に近い、逆に注射する量が少ないほど尿中への排泄は少なく便中へ遅れて出てくる。正常の尿中の B_{12} 含量がきわめて少ないことから、 B_{12} の生理的排泄門戸は尿でないことが明らかである。すなわち B_{12} は便中に失われるのがおもな排泄路と考えられるが(図 3)、便中に出るルートは胆汁その他の消化液と脱落腸粘膜の二つが考えられ、おそらく両者とも排泄に関与しているものと思われる。すなわち胆汁中に B_{12} が含まれることは筆者⁷⁾ が最初に報告したが、放射性 B_{12} を注射した後胆管を結紮しても便中に放射能が排泄されるので胆汁からの排泄は一部にすぎないと考えられ、放射性 B_{12} 注射直後の臓器分布をみると消化管粘膜に高濃度に取り込まれその後数日の間に急速に放射能が低下する⁸⁾ ことから考え、粘膜細胞に取り込まれた B_{12} が Villus の頂上から脱落する細胞とともに失われるものと考えられる。 B_{12} の腸肝循環の絶対量はわからないが、おそらくわずかであろう。

体にはいった B_{12} の化学的な変化とその回転はまだ十分明らかでないが、DBCC は腸管内で食品から遊離と同時に内因子と結合し保護されながらおもにそのままの形で吸収され、肝その他に運ばれてから上方配位子が徐々にはずれて他の型 ($\text{CH}_3\text{-B}_{12}$, OH-B_{12}) または再び同じ

DBCC となって補酵素としての役割を果たした後、徐々に体外に排泄されると思われる⁹⁾。他の型の B_{12} は主として肝臓で DBCC あるいは一部 $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ に転換される。体中の B_{12} の回転速度はきわめておそく、体に 1 回の注射で放射性 B_{12} を与えるとはじめ放射能の一部はすみやかに失われるが、その後は体の B_{12} プールにはいった B_{12} がきわめて徐々に失われ、その半減寿命は一年前後と考えられる¹⁰⁾。尿中への排泄は血漿中の B_{12} の型、すなわち B_{12} 結合タンパク (Transcobalamin I, II) と結合したものと遊離のものに分けて考えなければならない。遊離の B_{12} は糸球体濾過で尿中に失われるが¹¹⁾、尿細管も B_{12} 排泄に関係あるもののようで詳細はまだ明らかでない。

葉 酸

葉酸は動物および細菌の発育因子として発見されたもので、初めホウレン草の葉から濃縮され、次いで肝臓やイーストから 1944 年に結晶化され、構造が決定されたので葉酸 folic acid と命名された。これを発育因子とする細菌が数種類あり、その反応に差があることから葉酸の同族体が明らかとなった。葉酸は化学的には pteroylglutamic acid, PGA で、天然にある葉酸同族体はグルタミン酸が 1 分子ついているもの(遊離型ともよぶ)は少なく、3 分子ないし 7 分子がついたものが多く、さらに還元された型(tetrahydro 型)が主体をしめる。すなわち葉酸の活性型はこの tetrahydro 型 (THF) で、その 5N と 10N のところ、あるいは 5N と 10N の間に橋渡しのようにして $-\text{CHO}$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$, $=\text{CH}-$, CHNH , $-\text{CH}_2\text{OH}$ などがついたのが実際の補酵素型で、天然にはおもにこれらの型で存在する¹²⁾。

定量法と吸収測定法

生物学的試料中の葉酸の定量は B_{12} の場合と同様に微生物学的方法を用いなければならない。ヒトの血清中の活性は図 4 の右端に示したように *Lactobacillus casei* に対する活性は 5 ~ 17m $\mu\text{g/ml}$, *Streptococcus faecalis* と *Pediococcus*

PGA.....Reduced.....→THE					
Mono- Gluta- mate	Natural Poly- Gluta- mate	Mono- Natural		5N-methyl Serum Folate (m μ g/ml)	
		Gluta- mate	Poly- Gluta- mate		
<i>L. casei</i> :	+	+	+	+	5-17
<i>S. faecalis</i> :	+	+	-	-	0- 2
<i>P. cerevisiae</i> :	-	-	-	-	0- 2

図 4. 葉酸の型と微生物学定量用株との関係.

cerevisiae (*Leuconostrom citrovorum*) に対する活性はさらに低く 2 m μ g/ml 以下である. 血清中の葉酸活性の主体は非結合型の 5N-methyl 型と推定されているが, 血球中のものはグルタミン酸の多い結合型が主である¹²⁾.

L. casei および *S. faecalis* はグルタミン酸の多くついた葉酸には反応しないので, 食品中の葉酸測定のような場合, また血液の葉酸を遊離型と結合型を大まかに分けて測定する場合には γ 結合のグルタミン酸を切る酵素 conjugase を作用させる. それを使って調べると成人 1 日の食事に含まれる葉酸は遊離型が 157~160 μ g, 結合型が 520 μ g くらい, すなわち約 3/4 が polyglutamate で, 吸収率は結合型で 20%, 遊離型で 80% くらいといわれているが³⁾, 値は報告者でかなり異なる.

血液や尿中の葉酸の各型を分けて正確に測定することは必ずしも容易でないが, 吸収試験では葉酸を経口負荷して血清中の葉酸の上昇と尿中排泄量を短時間内に測定するものであるから, *L. casei* でも *S. faecalis* でもどちらを使っても大差はない. 吸収測定の目的に経口負荷後の糞便中の葉酸を定量することは, 腸内細菌による葉酸の合成があるので意味がない. 臨床の面で現在よく用いられている吸収試験は経口負荷後の血清葉酸活性の上昇と尿中排泄の測定である. たとえば, Pitney¹⁴⁾ の成績では 2mg の葉酸を経口投与した後の血清葉酸活性は 1 時間目に最高値に達し, その後すみやかに低下し (図 5), その下降は静脈注射後の下降と類似している. すなわち葉酸の吸収は胃内停滞の時間の

図 5 葉酸 2mg 経口投与後の血清葉酸濃度の上昇の正常範囲(Pitney ら¹⁴⁾による).

ラグを考慮すると, 腸管にはいった後はきわめてすみやかに吸収されと考えられる. 負荷量については研究者によって一定しないが, Chanarin¹⁵⁾は体重 kg 当たり 40 μ g の量を用い, 正常人では血清濃度が 51~142 m μ g の最大上昇を示したのに反し, 特発性脂肪下痢では 0~44 m μ g/ml しか上昇しなかったため, 吸収障害の判定に本法は有用であるとしている. また 3 mg を用いた場合の上昇は 42~170 m μ g/ml, 平均 96 $\pm$ 4 m μ g/ml であるとしている.

尿中排泄試験はそれ単独あるいは上記の血清中濃度測定と平行して行なってもよい. 葉酸の 1 日平均尿中排泄は Girdwood¹⁶⁾によれば 0.12~3.6 μ g 平均 1.7 μ g, Jandl¹⁷⁾によれば, 1.58~5.94 μ g, 平均 3.93 μ g でわずかであるが, 葉

酸 5 mg を経口投与すると前者の報告では 24 時間の尿中に正常人では 2.37 ~ 4.2 mg が排泄され、Cox ら¹⁸⁾ は経口投与 48 時間前に筋注で 5 mg を与え、組織に葉酸不足のない状態にした後 5 mg を経口投与してその後 24 時間尿を測定したが、その成績では正常人 20 名の平均排泄は平均 2.48 ± 0.50 mg であった。すなわち経口負荷量の 50% 前後が 24 時間尿に出るということである。なお特発性脂肪下痢の患者では 0.48 ± 0.11 mg で著明な低下を認めたが悪性貧血、脾臓不全、胃切除などでは排泄(吸収)低下は認められなかった。mg 単位の葉酸を与えるとやはり mg 単位の尿中排泄がおこり、負荷前の尿中の葉酸排泄量は μ g 単位で量的に問題にならないので無視できる。また Chanarin ら¹⁵⁾ は体重 kg 当たり 40μ g の負荷量を用いて 6 時間尿について検討し正常人の尿中排泄は 12 ~ 44% 平均 28 ± 1.8 %, 特発性脂肪下痢患者では 0 ~ 17%, 平均 4 ± 1.0 % であったとしている。Butterworth¹⁹⁾ は同じく 5 mg 経口投与後 5 時間の尿について測定し、正常 1.31 ± 0.44 mg (26%), スプルーでは 0.064 ± 0.071 mg (1.2%) と著差を認めた。Girdwood¹⁶⁾ の成績では 105 mg を経口投与した 2 例の 24 時間尿中排泄はそれぞれ 36.1 mg と 29.7 mg であった。すなわち吸収率は 5 mg の場合とほとんど異なる。

吸収機構, 部位, 排泄

Burgen と Goldberg²⁰⁾ はシロネズミの腸管に ^3H -葉酸を灌流し、葉酸濃度が 10^{-6} M 以下であれば吸収は濃度に関係があるが、それより高濃度では吸収が抑制されるとし、また粘膜→漿膜の移行が逆方向より 14 倍もすみやかであるので、葉酸の吸収は能動的搬送によるとした。Turner, Hugh²¹⁾ は同じ動物の反転腸管を用いた実験で濃度勾配に逆行して搬送するという所見が得られず、葉酸の吸収は被動的なものであると考えた。吉野は代謝拮抗剤などを用いて検討したがその影響が認められず、葉酸の吸収は被動的であろうと考えたが、Herbert ら²²⁾ は上部 1/3 腸管には能動搬送系があり主吸収部位であるとし、この問題は今日未解決である。

吸収部位に関してはヒトおよび動物で経口投与後吸収がきわめてすみやかであること、および結紮腸管内に注入した葉酸の吸収は十二指腸空腸のほうが回腸よりすみやかで、後者は前者の 50 ~ 60% 程度の吸収能しかないという成績から主吸収部位が上部小腸であるということは疑う余地がない。なお吸収された葉酸の尿中への排泄はすでに述べたとおりで、生理的状态における尿中排泄はわずかであるので、 B_{12} の場合と同じように他の主排泄経路からと推定されるが、詳細は今日不明である。静脈注射で与えた ^3H -葉酸は $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ くらいの量ではすみやかに血中から組織に取り込まれるが、 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ では明らかに血清からの clearance がおそくなる²³⁾。なお葉酸の回転は B_{12} よりはすみやかであると考えられているがその正確な測定はまだ行なわれていない。Herbert²⁴⁾ が自分で行なった葉酸欠乏実験では欠乏食投与開始後 22 日で血清葉酸が低下、95 日で尿中 FIGLU 増加、134 日で骨髓に巨赤芽球が出現し間もなく貧血が明瞭となった。すなわち B_{12} よりはるかに早く欠乏状態が現われる。

1 日の食事からの摂取量はさきにも述べたが、その推定量が研究によりかなり異なる。また消化管分泌液を介する腸肝循環がかなり大きい。血清中の葉酸は $5.5 \sim 16.0 \text{ m}\mu\text{g}/\text{ml}$ 、赤血球中では $105 \sim 454 \text{ m}\mu\text{g}/\text{ml}$ で前者が $3 \text{ m}\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下は明らかな欠乏と考えてよい。

文 献

- 1) Gräsbeck, R. et al.: Biochim. Biophys. Acta., **127**; 47, 1966.
- 2) 奥田邦雄: ビタミン, **29**; 69, 1964.
- 3) Okuba, K. and Sasayama, K.: Am. J. Physiol., **208**; 14, 1965.
- 4) Wilson, T. H.: Physiologist, **6**; 11, 1963.
- 5) Okuda, K. and Takedatsu, H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **123**; 504, 1966.
- 6) 奥田邦雄, 他: ビタミン, **33**; 275, 1966.
- 7) Okuda, K. et al.: J. Lab. Clin. Med., **51**; 17, 1958.
- 8) 米湊 徹: ビタミン, **44**; 76, 1971.
- 9) Okuda, K. et al.: J. Lab. Clin. Med., **74**; 218, 1969.

- 10) Reizenstein, P. G. et al.: J. Lab. Clin. Med., **62**; 255, 1963.
 - 11) Nelp, W. B. et al.: J. Lab. Clin. Med., **63**; 480, 1964.
 - 12) Stokstad, E. L. R. and Koch, J.: Physiol. Review., **47**; 83, 1967.
 - 13) Butterworth, C. E., Jr.: Brit. J. Haemat., **14**; 339, 1968.
 - 14) Pitney, W. R. et al.: J. Clin. Path., **13**; 440, 1960.
 - 15) Chanarin, I, and Bennete, M. C.: Brit. Med. J., **1**; 985, 1962.
 - 16) Girdwood, R. H.: Lancet, **2**; 53, 1953.
 - 17) Jandl, J. H. and Lear, A. A.: Ann. Int. Med., **45**; 1027, 1956.
 - 18) Cox, E. V. et al.: Gastroenterology, **35**; 390, 1958.
 - 19) Butterworth, C. E., Jr. et al.: J. Clin. Lab. Med., **50**; 673, 1957.
 - 20) Bergen. A. S. V. and Goldberg, N. J.: Brit. J. Pharmacol., 313, 1962.
 - 21) Turner, J. B. and Hugh, D. E.: Quart. J. Exp. Physiol., **47**; 107, 1962.
 - 22) Herbert, V. and Shapiro, S. S.: Fed, Proc., **21**; 260, 1962.
 - 23) Johns, D. G. et al.: J. Clin. Invest., **40**; 1681, 1961.
 - 24) Herbert. V.: Am. J. Clin. Nutr. **20**; 562, 1967.
-