老化に関する栄養学的研究 (Ⅲ)

Nutritional Study of Ageing (III)

アスコルビン酸欠乏モルモットに及ぼす酸化型アスコルビン酸の影響

Effect of Dehydroascorbic Acid on Ascorbic Acid Deficient Guinea Pigs

(昭和 43 年 9 月 25 日 受 理)

小 柳 達 男* 武 田 三恵子* 桜 井 和 人*
(Tatsuo Koyanagi) (Mieko Takeda) (Kazuto Sakurai)

Animal experiments were conducted to determine whether administration of dehydroascorbic acid to guinea pig produces diabetes as in the case of rat or prevents diabetes and elevates succinic dehydrogenase which has been in low level by deficiency of ascorbic acid. In one experiment effect of deficiency of ascorbic acid on pyruvic dehydrogenase in liver was also studied.

1) Whereas succinic dehydrogenase activity was decreased significantly in deficiency of ascorbic acid, pyruvic dehydrogenase activity did not.

2) After administration of dehydroascorbic acid to deficient animals ascorbic acid concentration in both plasma and liver and level of succinic dehydrogenase in liver recovered to normal.

体内での代謝の際に生ずる遊離根 (free radical) が老化の原因であり、その遊離根は SH 化合物により打消され老化が防がれているのであらうと考えられている¹⁾。従来ビタミン B₁₂ の欠乏は血中 SH を低下させるといわれていたが²⁾ 小柳ら³⁾ は鉄不足のときもネズミの血中 SH が低下することを認めた。

さてアロキサンをネズミに注射すると糖尿を生ずるようになるが、これはアロキサンが膵臓でインシュリンを合成している個所の SH を酸化して打消すためであって

その結果このホルモンの合成が阻害され糖尿になるのであると考えられている。Patterson⁴⁾ は酸化型アスコルビン酸 (DHA) の構造がアロキサンに似ていて同様に SH を酸化する作用があるのでネズミに多量に注射した結果、糖尿を生ずることを認めた。さらに DHA を注射するときに同時にシステインあるいはグルタチオン (GSH) のような SH 化合物を注射すると糖尿にならぬことも知った⁵⁾。それで DHA で糖尿を排泄するようになるのは多量の DHA 注射により、体内の SH が減少し膵臓の β 細胞が活性を失うためであらうと考えた。

さて Banerjee ら⁶⁾ はモルモットがアスコルビン酸 (AA) に欠乏すると肝のグリコーゲンが消失し、GSH が低下するとともに膵臓のインシュリン生産が減少し糖尿になるが、これに AA を与えると糖尿から回復することを認めた。このとき AA の代りにインシュリンを注射しても AA 欠乏により低下していた肝のコハク酸脱水素酵素 (SD) が正常に回復するので、AA はこの点ではインシュリンと同じ効果を示すものと考えた。

このようにネズミは DHA により糖尿になるが、AA に欠乏したモルモットに DHA を与えた場合はどうなるであろうか。ネズミと同じく糖尿になり SD は低下するか、それとも DHA が AA に還元されてモルモットを AA 欠乏から救い糖尿から回復し SD 活性も増すで

* 東北大学農学部

あろうか。

これらを明らかにするためにここに報告する実験を行った。またその実験を行なう前にモルモットは AA 欠乏の際に SD が減少しないという報告⁷⁾もあるので SD が減少するか否かを確かめ、SD と同じく炭水化物代謝の重要な酵素であるビルビン酸脱水素酵素についても比較のためその活性を調べた。

方 法

飼育：体重 200 g 内外の Hartree 系雄モルモットを 2 群に分け一方を欠乏群，他は対照群とした。底部金網製の飼育籠を使用した。飼料はカゼイン 30，デンプン 30，ダイズ油（肝油含有）7.3，塩類 6，酸化マグネシウム 0.5，酢酸カリウム 2.5，ビタミン混合 1，セロファン 15，コリン 0.2 (g) であって Reid⁸⁾ の報告しているものを多少変更した。ビタミン配合は AA を除いたものを用い，対照区には 100 g の飼料に対し 200mg の l-AA を添加した。

分析：この欠乏飼料で 30～40 日飼育しているとモルモットは AA の欠乏により体重を減じてくる。そこで第 1 試験ではそのまま，第 2 試験では DHA を注射後断頭放血し分析材料を採取した。SD は肝臓 1 g に 9 ml の 0.1 M リン酸緩衝液を加えて磨砕し懸濁液を作りその 1 ml を使用して Warburg 検圧計により酸素の吸収を測定し

た⁹⁾。基質濃度は 0.1M，阻害剤として使用するマロン酸ソーダは 0.2M にした。ビルビン酸脱水素酵素は検圧計により測定した¹⁰⁾。血漿の AA は Roe らの 2,4-dinitrophenylhydrazin 法¹¹⁾，肝臓の AA も同様の方法によって定量した。DHA は Patterson⁴⁾ の方法に従って作った。

結 果

第 1 試験：肝臓 SD およびビルビン酸脱水素酵素に及ぼす AA 欠乏の影響

AA 欠乏飼料を与えられ体重の減少が始ってから 3 日目に肝臓中 SD とビルビン酸脱水素酵素を測った結果を第 1 表に示した。これによると SD は欠乏モルモットにおいて明らかに対照群のものに比べて低下しているがビルビン酸脱水素酵素は欠乏群と対照群との間に差がなかった。なお欠乏モルモット肝ホモジェネートに in vitro で AA を加えたが SD の活性はほとんど変化がなかった。

第 2 試験：AA 欠乏モルモットの肝 SD ならびに血清および肝臓中 AA に及ぼす DHA の影響

モルモットを 30 日および 40 日間欠乏飼料で飼育すると第 2 表に示すごとく SD は低下し，血清および肝臓中 AA も低い値に達した。そこで 40 日間欠乏飼料を与えた動物に 100mg の DHA を腹腔内に注射し 6 時間後およ

第 1 表 肝臓 SD およびビルビン酸脱水素酵素に及ぼす AA 欠乏の影響

	血 漿	肝 臓	副 腎	SD ³⁾	ビルビン酸 ⁴⁾ 脱水素酵素
	AA mg/100 ml	AA mg/100g	AA mg/100g	O ₂ μ l/h/mg	O ₂ μ l/h/mg
対 照 ¹⁾	1.07 $\pm$ 0.05 ³⁾	5.42 $\pm$ 1.75	27.6 $\pm$ 8.10	26.9 $\pm$ 2.87	6.72 $\pm$ 2.10
欠 乏 ²⁾	0.20 $\pm$ 0.05	2.34 $\pm$ 1.45	6.5 $\pm$ 2.06	9.2 $\pm$ 3.83	5.63 $\pm$ 1.64

1) 体重 360～470 g 2) 体重 212～460 g 3) 10%酵素液 0.1 ml, 0.1M コハク酸 Na 0.3 ml, 4×10^{-3} M CaCl₂ 0.3 ml, 4×10^{-3} M AlCl₃ 0.3 ml, 緩衝液で 2.5 ml 4) 酵素液 0.1 ml, 0.1 M ビルビン酸 Na 0.3 ml, Krebs-Ringer 液 1 ml 5) 6 頭平均 $\pm$ 標準偏差

第 2 表 AA 欠乏モルモットの血漿，肝臓の AA，肝臓の SD に及ぼす AA あるいは DHA の影響

	血 漿	肝 臓	S D
	AA mg/100 ml	AA mg/100g	O ₂ μ l/h/mg
対 照 ¹⁾	0.69 $\pm$ 0.18 ⁴⁾ (6)	6.76 $\pm$ 1.18	11.06 $\pm$ 1.19
欠乏 30日 ²⁾	0.20 $\pm$ 0.02 (5)	2.32 $\pm$ 0.89	6.73 $\pm$ 1.36
欠乏 40日 ³⁾	0.19 $\pm$ 0.05 (4)	1.93 $\pm$ 0.56	6.29 $\pm$ 0.32
欠乏40日, AA 注射 6 h 後	2.41 $\pm$ 0.57 (4)	25.73 $\pm$ 5.04	9.03 $\pm$ 0.40
欠乏40日, DHA 注射 6 h 後	1.42 $\pm$ 0.43 (4)	19.06 $\pm$ 7.89	8.60 $\pm$ 0.54
欠乏40日, AA 注射 24 h 後	0.89 $\pm$ 0.02 (4)	12.25 $\pm$ 3.50	8.86 $\pm$ 0.79
欠乏40日, DHA 注射 24h 後	0.60 $\pm$ 0.10 (4)	13.82 $\pm$ 3.29	9.18 $\pm$ 0.40

1) 体重 445～602 g 2) 体重 395～485 g 3) 体重 320～450 g 4) 平均 $\pm$ 標準偏差, ()内は頭数

び24時間後にSDを測定した。その結果は同表に示すようにDHAの代りにAAを注射したものと全く差がなく、欠乏区より高く対照区のモルモットの値に近い結果を示した。

血清および肝臓中のAA含量はDHA注射後6時間においてはAA注射のものよりは劣るが無処理の対照区および欠乏区のものより著しく高い値を示した。24時間後では血中のAA含量は両群とも対照区のものに近くなったが肝臓ではなお対照区の2倍の高濃度を示し、AAとDHAとの間に差は認められなかった。

考 察

われわれの実験ではモルモットがAAに欠乏するとHarrerら¹²⁾やBanerjeeら⁶⁾の報告と同じく肝臓のSDが減少した。これは阿部らの成績とは一致しなかった。

SDとともに同時に測定したビルビン酸脱水素酵素は対照区のものとの差がなくAAの欠乏によっても低下しなかった。従来モルモットがAAに欠乏した場合の肝臓の酵素活性についての研究ではSDのほかリンゴ酸脱水素酵素⁶⁾、乳酸脱水素酵素⁸⁾、フォスファターゼ⁹⁾、チトクロム酸化酵素⁹⁾、エステラーゼ⁹⁾の減少が認められている。ビルビン酸脱水素酵素についてはAA欠乏の際に測定した報告が見あたらないがわれわれの実験により低下しないことがわかった。同じように炭水化物代謝に関与した酵素に対しAA欠乏の影響がこのような異なるのは興味がある。

さて今回の試験でAAに欠乏したモルモットにDHAを注射してみると、低い値に下っていた血中と肝中のAAおよび肝中のSDが正常に復し何ら悪影響は認められなかった。これはPattersonがネズミにDHAを与えた場合に糖尿を生じた結果と著しく異なっている。モルモットはAAを合成できないという根本的な差異がネズミとの間にあるが、アロキサンに対してもネズミと違い抵抗が強く、これを注射しても糖尿にならぬことをWest¹³⁾らが報告している。モルモットにDHAを多量に注射しても肝中でAAが多量に見出されたことから判断するとアロキサンやDHAを還元する力はモルモットに強いものと思われる。

われわれの実験でも注射されたDHAはモルモット体内で還元されAAを与えたと同じ効力を示した。したがってネズミにDHAを注射すると糖尿になるが、AA欠乏のモルモットの場合はDHAにより糖尿になるどころか反対に糖尿から回復するように作用するようである。AA欠乏で低い値に下っていたSDもDHAの注射で対照区と等しい値に回復することをわれわれは認めたが

これはDHAからAAができてこれによりインシュリンの生産が増したためであると考えられる。

DHAはAAに欠乏したモルモットにはAAに等しい効果を示すがDHAがAAに還元されるためにはモルモットは体内のSHを消費してこれを行なわねばならぬ。Banerjee¹⁴⁾はDHAの注射により血中SHは変化しないが肝中SHが激減することを観察している。

PattersonはネズミにDHAを多量に注射するとアセチルコリンを注射されたような過敏症状を示すことを報告している。Claytonら¹⁵⁾はAA欠乏モルモットにDHAを連日20~60mgという多量を経口投与するとAA欠乏症状は消失し、無投与のものより生存日数は僅かに延びるが、手足の脱毛がおこり、指が曲がり最後には呼吸困難になって死亡することを認めている。そうしてこの毒性はモルモットがDHAを還元する能力を失ったためであろうと考えている。

以上のことからDHAはモルモットの壊血病を防ぎインシュリンの生産を正常にすることはできるが体内SHの減退を招くことは避けられない。もし少量のDHAを長期にわたって与えるならば慢性的にSHの低下を来し老化を促進することになるだろう。

要 約

AAに欠乏したモルモットにDHAを与えるとネズミの場合のように糖尿になるか、それともAAに還元されてAA欠乏に伴う肝のSDの低下を防ぐかを明らかにするために欠乏モルモットへのDHAの影響を研究した。またAA欠乏の際にモルモットの炭水化物代謝の障害が起きるといわれているので、この代謝に関係したSDのほかにビルビン酸脱水素酵素についても検討した。

その結果(1) AA欠乏モルモットではSDは低下するがビルビン酸脱水素酵素は変化しなかった。

(2) AA欠乏モルモットにDHAを注射するとこれは直ちにAAに還元され、低下していたSDは正常に復した。このようにDHAはモルモットに対しAAの効果を出すことができるが体内のSHを減少させるという欠点がある。これは老化現象と関係があると思われる。

酵素実験に助力された高屋元雄氏に感謝する。

文 献

- 1) Harman, D.: *J. Geront.*, **11**, 298 (1956)
- 2) Ling, C. T. & Chow, B. F.: *J. Biol. Chem.*, **202**, 445 (1953)
- 3) 小柳達男, 湧口泰昌, 北浦昭三, 高橋伸子: 栄養と食糧, **22**, 91 (1969)
- 4) Patterson, T. W.: *J. Biol. Chem.*, **183**, 81 (1950)

- 5) Patterson, T. W.: *J. Biol. Chem.*, **186**, 141 (1950)
- 6) Banerjee, S., Biswas, D. K. & Singh, H. D.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 405 (1959)
- 7) 阿部士良, 外山 進, 市川ちづ子: 東京医大, **16**, 747 (1958)
- 8) Reid, M. E. & Briggs, G. M.: *J. Nutr.*, **51**, 341 (1953)
- 9) 酵素研究法 I, 赤堀四郎編, 朝倉書店
- 10) Stumpf, P. K., Zarudnaya, K. & Green, D.E.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 817 (1947)
- 11) Roe, J. H., Wills, B. M., Oesterling, M. J. & Damron, C. M.: *J. Biol. Chem.*, **174**, 201 (1948)
- 12) Harrer, C. J. & King, C. G.: *J. Biol. Chem.*, **138**, 111 (1941)
- 13) West, E. S. & Highet, D. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68**, 60 (1948)
- 14) Banerjee, S.: *Nature*, **152**, 329 (1943)
- 15) Clayton, B. E., McSwiney, R. R. & Prunty, F. T. G.: *Biochem. J.*, **58**, 542 (1954)

脱脂粉乳およびチョコレートの摂取と血清脂質ならびに皮膚脂質

19~21才の男女各14人, 15人に, 脱脂粉乳と体重 kg 当り28 g のチョコレートを含む試験食を24時間毎に与え5日目の空腹時に採血して血清中のコレステロールおよびトリグリセリド量を測定し, 試験食投与前の値と比較した。コレステロールは, 男性では血清 100ml 当り 14 mg の減少であったが, 女性では 7.8mg の減少にすぎなかった。トリグリセリド量は男性で変化がないのに対し, 女性では 5.3mg の増加がみられた。顔の表面をジ

エチルエーテルを含ませた綿布でふき取り皮膚の脂質について同様に検査した。皮膚のコレステロールは試験食摂取によってめだった変化がみられなかったが, トリグリセリドは, 男性で明らかに減少した。しかし女性では変化がみられなかった。

Effect of a skimmed milk and chocolate diet on serum and skin lipids. Macdonald, I.: *J. Sci. Food Agric.*, **19** (5), 270~272 (1968)

(堀井)