デンプングリコール酸ナトリウムの生化学的 分解に関する研究 (第5報)

デンプングリコール酸ナトリウムのラットにおける代謝について

(昭和 46 年 4 月 22 日受理)

林 敏 夫*

Studies on Biochemical Hydrolysis of Sodium Carboxymethylstarch (V) Metabolism of Na-CMS in Rats

Toshio HAYASHI

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome,
Setagaya-ku Tokyo)

Sodium carboxymethylstarch (Na-CMS) labeled on the position of 2-C carboxymethyl group was prepared, and its 2% aqueous solution was administered to the rat by gastric intubation, and the resultant radioactivity of the solution was estimated at 0.8 Ci/ml.

The author found that 5.6% of the radioactivity was expired as CO₂ within 96 hours, 1.8% excreted into the urine and 83% found in the faeces.

The urine was tested by thin layer chromatography using cellulose powder as adsorbent. As the result, three bands were conspicuous to some extent than the others. The first band, which was regarded as Na-CMS contaminated with faeces, was found on the starting line, the second band at the point of the R_f value 0.37 regarded as glucose derivative, and the third band at the point of the R_f 0.67 whose entity was not known.

Na-CMS in the faeces was determined with 2,7-dihydroxynaphthalene, which was 79.1% of the dosage administered.

(Received April 22, 1971)

まえがき

一般にデンプンを摂取した場合、そのほとんどが体内で分解吸収され、TCA サイクルにより生命維持に大きな役割を果たすことは、すでによく知られているが、デンプングリコール酸ナトリウム (sodium carboxymethylstarch, Na-CMS と略す) はすでに報告したように、*in vitro* におけるアミラーゼなどによる分解はデンプンに比べて著しく劣っている。しかし、Na-CMS を動物に投与した場合の体内における挙動については、まだ報告が見当たらない。そこでカルボキシメチル基 (CH₂COO⁻) にラベルした 2-¹⁴C-Na-CMS をラットに強制投与した場合の排泄物中の C-14 を測定することにより体内の利用率を検討した。

1. 実験方法

1-1 試薬、装置および実験材料

1-1-1 試薬

シンチレーター 溶液 (二酸化炭素吸収液): エタノール・アミン・メチルセロソルブ・トルエン (1:3:6) 混液 1 L に 2,5-diphenyloxazol (P.P.O.) 5 g, 1,4-di-[5-phenyloxazolyl-(2)] benzene (P.O.P.O.P.) 0.3 g を溶かした。なお、ここに用いた P.P.O., P.O.P.O.P. はシンチレーター用 (東京化成製)、その他は特級試薬を用いた。

酸化剤: 硫酸 (試薬特級) 333 ml とリン酸 (試薬特級) 167 ml の混液に無水クロム酸 (試薬特級) 25 g を溶かしたものを用いた。

二酸化炭素洗浄液: 塩化第一スズ (試薬特級) 10 g を塩酸 (試薬特級) 10 ml に溶かし、水を加えて 100 ml

*国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Fig. 1. Apparatus used for wet combustion of carbon and absorption of liberated radioactive carbon dioxide

- A: oxydation agent
B: washing solution for carbon dioxide
C: scintillator solution

とした。

トリス緩衝液: A 液 tris-(hydroxymethyl)-amino-methane 24.2 g および無水マレイン酸 19.6 g を水に溶かして 1 L とした。B 液: 0.2 M 水酸化ナトリウム溶液。A 液 50 ml に B 液 54 ml を混和した。pH 7.4。試薬は特級使用。

タンパク質消化酵素: プロナーゼ P (45,000 p. u. k./g, 科研化学製)

アンスロン・硫酸溶液: アンスロン 0.1 g を硫酸 (s. g. 1.84) 100 ml に溶かし、4 時間放置後水 35 ml 中に冷却しながら加えた。

薄層クロマトグラフィー用展開溶媒: i) ベンゼン・メタノール・酢酸 (90:16:8) 混液。ii) *n*-アミルアルコール・エタノール・5 % アンモニア水 (4:3:3) 混液。

1-1-2 装置

湿式酸化装置: Fig. 1 に示す装置²⁾を使用した。

液体シンチレーションカウンター: Aloka, LSC-601 型。

分光光度計: 日立分光光度計 EPU-2 型。

1-1-3 実験材料

実験動物: 体重 245~280 g のウィスター系ラットのオスを使用した。

¹⁴C-Na-CMS: デシケーター (硫酸) 中で 1 夜減圧乾燥したバレイショデンプン (国立衛生試験所標準品) 2 g にメタノール 2.5 ml を加えて混和し、これに 2-¹⁴C-monochloro acetic acid 0.4 mCi (6.4 mCi/mM) および無標識 monochloro acetic acid 560 mg を水 1 ml に溶かし、炭酸ナトリウムで中和した液を徐々に加えて混和した。これに 30 % 水酸化ナトリウム溶液 0.6 ml を加え、水浴 (35°) 中で 1 時間振り混ぜながら反応させた。その後、温度を 40~42° に上昇させて振り混ぜながら 4 時間加温して反応を終了させた。これにメタノール 2 ml

を加え、さらにメタノール・10 % 塩酸 (3:1) 混液で中和し、ろ過後ろ紙上の残留物を 80 % メタノールで Cl⁻ の反応がなくなるまで洗浄した後、さらにエーテルで洗浄して ¹⁴C-Na-CMS を得た。(収量 1.98 g)。

本品の 0.5 % 溶液 20 μ l および標準としての 1 % monochloroacetic acid 溶液 2 μ l につき、シリカゲル G プレート (20 $\times$ 5 cm, 展開溶媒 i) を用いて薄層クロマトグラフィーを行なった。展開後のプレートにつき、0.05 % ブロムクレゾールグリーン・エタノール溶液で標準 monochloroacetic acid のスポットを確認した後 (Rf: 0.62), ラジオクロマトグラフ装置 (Packard 社製, 7,200 型) にかけてが、ピークは 1 つのみであり、2-¹⁴C-monochloroacetic acid は認められなかった。

また本品の放射能を後述の方法で測定したところ、0.8 μ Ci/ml であった。なお置換度はナフタレンジオール法³⁾で測定した結果 0.37 であった。

1-1-4 ¹⁴C-Na-CMS の投与

ラット 3 匹ずつを 1 グループとし、2 % ¹⁴C-Na-CMS 溶液 2 ml ずつを胃ゾンデを用いて胃内に強制投与した。

1-1-5 排泄物の採取

(1) ふんおよび尿

ケージ内で網目約 1 cm 平方の金網上のラットの排泄するふんは、ケージ下部のふん、尿排出口の下に置いた金属製サラに、また尿は試験管に受け、一定時間ごとに受器を取替えて採取した。

(2) 呼吸

Fig. 2 に示す装置を用いた。空気はアスピレーターで吸引して通気され (約 200 ml/min.), 空気中の二酸化炭素は 50 % 水酸化ナトリウム溶液で洗浄、吸収させた。

ラットが排出する呼吸は硫酸で洗浄して水分を除去した後、モノエタノールアミン・メチルセロソルブ (2:1) 混液に吸収させた。この混液は 2 つの吸収ビンに入れ、液量は第 1、第 2 の吸収ビンとも通気 1 時間当たり 10 ml とし、一定時間ごとに新しい液と交換した。

なお装置内のラットには水のみを与え、給飼は行なわなかった。またふんおよび尿は約 12 時間ごとに取り除いた。

1-1-6 放射能の測定

ふんは赤外線ランプを用いて十分に乾燥した後秤量し、全量を乳バチ中ですりつぶしてよく混和した後、亀谷ら²⁾の湿式酸化法により ¹⁴C を二酸化炭素として捕集した。すなわち、細粉した試料約 30 mg を精秤して湿式酸化装置の三頸フラスコにとり、フラスコ内に窒素ガスを通じながら酸化剤 40 ml を滴加し、小火炎で 10 分間加熱して発生する二酸化炭素を二酸化炭素洗浄液に通した後、シンチレーター溶液 20 ml を入れたバイアルビン中に導き吸収させた。加熱後 20 分間そのままの状態に放置した後、バイアルビンをとってせんを施し、液

Fig. 2. Apparatus used for absorption of carbon dioxide in expiration of rats

- A: 50% Sodium hydroxide solution
 B: Chamber for rats
 C: Sulfuric acid
 D₁, D₂: Absorption agent
 E: Water

体シンチレーションカウンターで10分間放射能を測定し、その値から1分間当りの放射能を算出した。対照としては、試料を用いない場合は試料の場合と同様に操作したものを用いた。

尿については採取量をあらかじめ計量した後、その1 ml を三頸フラスコにとり、ふんの場合と同様に測定した。また呼吸は二酸化炭素を吸収させた液 3 ml をバイアルビンにとり、呼吸用シンチレーター溶液（トルエン・メチルセロソルブ(12:5)混液 850 ml に P. P. O. 5 g および P. O. P. O. P. 0.3 g を溶かした液) 17 ml を加えて混和し放射能を測定した。

1-1-7 尿の薄層クロマトグラフィー

尿 25 μ l をセルロースプレート(アビセル, 10 $\times$ 5 cm) に帯状に塗布し、展開溶媒 ii) を用いて約 6 cm 展開した後風乾し、原線から幅 5 mm ごとにかきとってバイアルビンに入れ、薄層クロマトグラフィー用シンチレーター溶液(トルエン 500 ml に P. P. O. 2.5 g, P. O. P. O. P. 0.15 g を溶かした液) 20 ml を加えた後、さらに懸濁剤として thixin 0.5 g を加えてよく振り混ぜ、均一にした液について液体シンチレーションカウンターで10分間放射能を測定し、その値から1分間の放射能を求めた。

1-1-8 ふん中の ^{14}C -Na-CMS の定量

既報の Na-CMS の定量⁴⁾ に準じて行なった。すなわち、乾燥して粉末にした試料 3 g に水 20 ml および 1 N 水酸化ナトリウム溶液 1 ml を加え、ときどき振り混ぜながら30分間放置した後遠心分離し、上分離し、上澄液をとった後、残留物は少量の水で2回洗浄して遠心澄液ははじめの上澄液と合わせた。この液を 0.5 N 塩酸で pH 7.4 とした後緩衝液 5 ml を加え、タンパク質分解酵素の 1% 液 2 ml を加え、40 $^{\circ}$ に1時間保った

後、冷後10%硫酸銅溶液 2 ml を加え、pH を6.0に調整し、析出した沈殿を遠心分離した。沈殿は70%メタノール溶液で洗浄した後10%アンモニア水 10 ml に溶かし、さらに水を加えて 50 ml とした。この液 2 ml に水を加えて 5 ml とし、さらにアンスロン・硫酸溶液 20 ml を加え、10分間沸騰水浴中に加熱し、冷後分光光度計により波長 625 m μ における吸光度を測定した。別に ^{14}C -Na-CMS とほぼ同じ置換度 (0.38) の Na-CMS を用いて作製した検量線よりその量を求めふん中の ^{14}C -Na-CMS の量とした。

2. 結果および考察

2-1 呼吸中の放射能について

ラットに投与した放射能量は一匹あたり 1.6 μCi であったが、このうち一定時間ごとに測定した放射能の検出率は Fig. 3 に示したとおりである。すなわち、投与直後から4時間までの呼吸中の放射能合計量は投与量の 0.08% であったが、その後の4時間ごとの排出率は 0.20, 0.35% と漸増し、投与後12~24時間の12時間で2.32% が排出され、実験期間中の最高値を示した。したがって投与直後から24時間の検出率は2.95% となり、これは実験実施期間における総検出率(5.58%)の半量以上に当る。

このように呼吸中に放射能が検出されたのは CMS の分解物が体内に吸収された後、グルコースとカルボキシメチル基とのエーテル結合がおそらく酵素などの作用により切断され、生じたグリコール酸がさらに分解されて二酸化炭素となり排出されたと考えられる。一方のグルコースは一般のグルコースと同様の代謝経路をたどったものと推定される。

なお24時間以降においても放射能は漸減しながらも排出され、投与後84~96時間においてもなお0.33% が検出

Fig. 3. Time course of radioactivity of carbon dioxide in expired air of rat

された。これは脂肪、タンパク質などに取込まれた C-14 が徐々に代謝されたということも考えられる。

2-2 ふんおよび尿中の放射能について

ふんおよび尿中に排泄された放射能の測定結果は Fig. 4 に示すとおりで、投与直後から12時間以内に投与量の約73%がふん中に、また1.6%が尿中に検出された。またその後の12時間ごとの測定で、ふんにおいては

Fig. 4. Time course of radioactivity in the faeces and urine

—: faeces

- - - : urine

7, 2.8, 0.8%, 尿にあっては0.1, 0.08%が検出されたが、尿は投与後36時間以降、ふんの場合は48時間以降は

Table 1. Radioactivity of Thin Layer Chromatograms of the Urine Excreted within 24 hours

Number	Distance from origin (mm)	Rf value	Counting time (min)	Total count	Radioactivity (cpm)
1	-2.5 ~ 2.5	0.00	10	813	36.1 ± 3.6
2	2.5 ~ 7.5	0.08	10	545	9.7 ± 3.2
3	7.5 ~ 12.5	0.17	10	517	6.5 ± 3.1
4	12.5 ~ 17.5	0.25	10	491	3.9 ± 3.1
5	17.5 ~ 22.5	0.33	10	589	13.7 ± 3.2
6	22.5 ~ 27.5	0.42	10	527	7.5 ± 3.1
7	27.5 ~ 32.5	0.50	10	434	0.0 ± 2.9
8	32.5 ~ 37.5	0.58	10	540	8.8 ± 3.2
9	37.5 ~ 42.5	0.67	10	773	32.1 ± 3.5
10	42.5 ~ 47.5	0.75	10	438	0.0 ± 3.0
11	47.5 ~ 52.5	0.83	10	478	2.6 ± 3.0
12	52.5 ~ 57.5	0.92	10	419	0.0 ± 2.9
13	57.5 ~ 62.5	1.00	10	455	0.3 ± 3.0
14	Blank	—	10	452	—

Developing solvent: *n*-amyl alcohol-ethyl alcohol-5% ammonia water (4:3:3)

Adsorbent: Cellulose (Funakoshi Co.)

The equation used in the calculation of radioactivity:

$$R = N/T - n/t \pm \sqrt{N/T^2 + n/t^2}$$

R: radioactivity

N: count number of the sample

n: count number of the blank

T: estimation time of the sample

t: estimation time of the blank

ほとんど検出されなかった。したがって、投与時から48時間であん中に約83.6%, 尿中に約1.8%, 合計 85.4% が排出されたことになる。しかし実験に用いたケージではふんと尿を完全に分離して採取することは不可能であったため、尿がふんで汚染される可能性があり、尿中に検出された放射能が排泄時の尿にはじめから存在していたかどうかについては判断としない。そこで、投与直後～24時間の尿について薄層クロマトグラフィーを行なった後、プレートの担体（セルロース末）を5mm 間隔で削りとり、放射能を測定した。その結果は Table 1 に示すとおりである。

なお C-14 を取り込んで排泄される可能性のある数種の物質についても、同じ条件で薄層クロマトグラフィーを行なって、それぞれの Rf 値を求め (Table 2), 尿のクロマトグラムと比較した。その結果、尿中に排泄された放射能のほぼ30%は原点に止まった。これはふん中に

Table 2. Rf Values on Thin Layer Chromatograms of Some of the Substances Contained in the Urine and Related Substances

Substance	Rf value
Glucose	0.38
Glucuronic acid	0.18
Hippuric acid	0.56
Urea	0.48
Carboxymethylglucose	0.37
Carboxymethylstarch	0.00
Glycolic acid	0.22

Developing solvent and adsorbent are the same as those shown in Table 1

Table 3. Sodium Carboxymethylstarch in Rat Faeces Determined with Naphthalenediol

Excretion period (hr.)	Faeces (dried, g)	Na-CMS found (mg)	Recovery (%)
0~12	0.64	27.37	68.42
12~24	1.99	3.18	7.96
24~36	1.35	0.82	2.05
36~48	2.20	0.27	0.68
Total	—	31.64	79.10

Amount of Na-CMS given per rat: 40 mg

排泄された Na-CMS が排泄後の尿に混入したものと考えられる。また Rf 値 0.33 付近に他の部分に比べてやや高い値が測定されたが、これは Na-CMS の分解によって生じたカルボキシメチルグルコースかまたはグルコースと考えることができる。なお0.67付近に比較的強い放射能が検出されたが、このものについては不明である。そのほか、グルクロン酸、馬尿酸の存在が予想される部分については、測定値が低いため判定は困難であった。また尿素に相当する部分には放射能は検出されなかった。

2-3 ふん中の Na-CMS 量

放射能測定の結果、投与放射エネルギーの約84%がふん中に検出されたが、念のため、ナフタレンジオール法によりふん中の Na-CMS 量を測定した。結果は Table 3 に示すように、放射能測定により求めた値よりもやや低い値を示したが、これは抽出時あるいは測定時の誤差などを考慮すれば、ほぼ近似的なものと考えられる。したがって本法の結果からも投与した Na-CMS の大部分がふん中に排泄されることが証明された。

3. 結 論

^{14}C -carboxymethyl group をもつ Na-CMS をラットに投与し、その排泄について検討を加えた。その結果、投与直後から96時間までで投与量の約5.6%が呼気中に排出された。またふん中には約83.6%, 尿中には約1.8%が排泄された。しかし、尿中にはふん中のものも1部混入していると考えられたので、薄層クロマトグラフィーを行なった結果約30%がふんに由来するものと考えられ、尿中に排泄された放射能は投与量の約1.2%と推定された。尿中にはカルボキシメチルグルコースあるいはグルコースとして1部が排泄されることが推定されたが、このほかにも不明物質が検出された。

以上のことから、Na-CMS 体内における利用率は6.8%以内と推定され、デンプンに比べるとはるかに低率であると判断された。

本実験を行なうに当たり、ご鞭撻いただいた国立衛生試験所長 川城 巖博士、同所食品添加物部長谷村頭雄博士ならびにご校閲いただいた同所薬理部長大森義仁博士に謹謝する。またご協力下さった陸上自衛隊福岡地区病院杉山明徳技官、聖徳栄養短期大学講師高村一知氏、

放射線実験にご助言を賜った国立衛生試験所放射線化学
部亀谷勝昭技官, 同 長谷川 明技官に深謝する。

文 献

- 1) 林 敏夫: 食衛誌, **8**, 151 (1967).
- 2) 亀谷勝昭, 井上陽一, 丸山孝一: *Radioisotopes*,
16, 41 (1967).
- 3) R. W. Eyler, E. D. Klug, F. Diephuis: *Anal. Chem.* **19**, 24 (1947).
- 4) 林 敏夫: 食衛誌, **6**, 489 (1965).