

氏 名 (本籍)	やま だ しょう じ 山 田 正 二 (新潟県)
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 1 1 0 号
学位授与年月日	昭和 4 7 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学位論文題目	ビタミン B ₁₂ 吸収に関する比較栄養 学的研究 ー特に、内因子の生理学的意義および 受容体の性質についてー
論文審査委員	(主 査) 教授 木 村 修 一 教授 金 田 尚 志 教授 津 田 恒 之

論文内容要旨

摂取した栄養量はそれが腸管から吸収され、それを要求する臓器、組織に取り込まれなければならないことは言うまでもない。ビタミン B_{12} はその吸収に、胃粘膜で合成され胃液に分泌される内因子の介助を必要とする。摂取されたビタミン B_{12} は胃で内因子と結合して複合体となって小腸に達し、そこで内因子の働きによって吸収される。何故このような因子を必要とするのか現在明らかでない。微生物や条虫ではこのような因子なしにビタミン B_{12} を取り込むことが知られており、あるいは進化の過程で単純なものから複雑な系をもつようになるに従って必要に応じて獲得した機構かも知れない。内因子の必要度は食性によって違っていて、肉食動物は大量のビタミン B_{12} を摂取するので内因子を必要としないだろうという説が最近出されているが、まだ推測の域を出ない。

近年、栄養素の腸管吸収時における腸管内環境の問題が重要視されつつあり、また物質の膜透過の際のco-factorの関与についての研究が盛んであるが、ビタミン B_{12} の吸収においてco-factorともいえるような役割を果たしている内因子の生理的意義を明らかにすることは栄養学の分野における重要な課題の一つと考えられる。

そこで本研究はビタミン B_{12} の吸収の第一段階と考えられるビタミン B_{12} -内因子複合体の受容体への吸着について検討し、内因子の生理的意義と作用機序の解明への手懸りを得ようとしたものである。ビタミン B_{12} -内因子複合体の受容体への吸着の様相を種々の条件下について比較し、また種属特異性についての従来の知見を発展させるとともに臓器の特異性について調べ、さらにビタミン B_{12} の腸管吸収が内因子に依存していない幼若シロネズミにおけるビタミン B_{12} 吸着の特殊性について検討をして研究を進めた。

第1章 小腸粘膜における内因子依存のビタミン B_{12} 吸着の性格

ここでin vitroでの小腸粘膜への内因子依存のビタミン B_{12} の吸着の性格について若干検討した。

第1節 内因子依存ビタミン B_{12} 吸着能の分布

胃直後から盲腸直前までを8等分してそれぞれの内因子依存ビタミン B_{12} 吸着能を測定すると図1のような結果が得られた高い値を示しているⅢ、Ⅳ、Ⅴの部分はin vivoで主な吸収部位であることが証明されている。

要約 小腸においてビタミン B_{12} 吸収能の分布

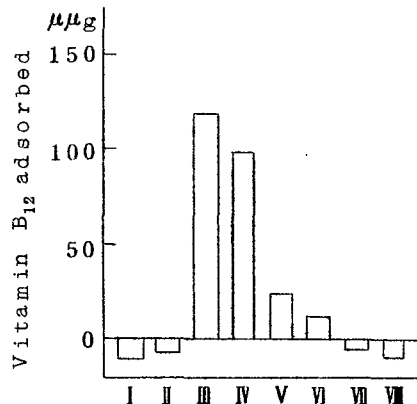


Fig.1 Distribution of intrinsic factor dependent vitamin B_{12} adsorptive capacity in the intestine.

が一致しているという結果が得られ、ビタミンB₁₂吸収過程でビタミンB₁₂-内因子複合体の受容体への吸着という段階が1つの重要な鍵となっていることを強く示唆している。またこの他に、ビタミンB₁₂の吸収において2価陽イオンはビタミンB₁₂-内因子複合体が受容体に吸着する段階に関係していることを証明した。この吸着にエネルギーは必要でないことがわかった。

第2章 幼若シロネズミ小腸粘膜におけるビタミンB₁₂吸着

第1部 幼若シロネズミのビタミンB₁₂吸着の特殊性

シロネズミの幼若期には経口投与したビタミンB₁₂の吸収能力が大きいという報告がある。また *in vitro* で小腸リングによる内因子非依存のビタミンB₁₂の取り込みは組織重量あたりで幼若期には成熟期にくらべ著しく多いことが知られている。そこで小腸粘膜へのビタミンB₁₂の吸着の様相を生後48時間の幼若シロネズミと成熟シロネズミについて比較検討した。

第1節 幼若シロネズミ胃における内因子様作用物質の生成

表1のように幼若シロネズミの胃にはビタミンB₁₂を結合するような物質は成熟シロネズミに比べ、はるかに少なかった。また幼若シロネズミ胃粘膜抽出標品は幼若および成熟シロネズミのいずれの小腸においてもビタミンB₁₂吸着を増大させなかった。

Table 1 B₁₂ binding capacities and intrinsic factor (IF) activity of gastric preparations obtained from adult and unweaned rats.

B ₁₂ binding capacity of gastric mucosa of rats (C)		IF activity (E*) or the small intestine of rats (M±SD, n=5)			
		Adult rats		Unweaned rats	
μg B ₁₂ /mg gastric mucosa (wet wt)		System A**	System B**	System A**	System B**
Adult	954.6	%	%	%	%
Unweaned	35.2	202±64 4±12	184±41 10±11	-8±12 -1±15	-20±5 -3±5

*E = $\frac{(U-C) \times 100}{C}$ ** System A; Individual intestinal preparation vs. pooled gastric preparation
System B; Pooled intestinal preparation vs. individual gastric preparation

第2節 小腸粘膜へのビタミンB₁₂の吸着

小腸粘膜へのビタミンB₁₂吸着量を体重1kgあたりで比較すると表2のように幼若シロネズミのほうがはるかに高い値を示した。

要約 幼若期における小腸粘膜のビタミンB₁₂吸着は成熟期におけるそれと全く性質を異にするものであることがわかった。すなわち1)吸着量が多い。2)内因子の効果がない。3)幼若期には胃で内因子は生成されない。4)幼若期の胃から幼若期の小腸に対してのみに特異的に作用

Table 2 Effects of gastric preparations of unweaned and adult rats on the adsorption of B₁₂ to intestinal preparations of unweaned and adult rats.

Gastric preparation from	Adsorption of B ₁₂ to the small intestine of rats (M±SD, n=5)			
	Adult rats		Unweaned rats	
	System A*	System B*	System A*	System B*
Adult rats	4.5±1.3	9.3±1.3	40.4±14.2	29.5±1.9(μg B ₁₂ /kg body wt)
Unweaned rats	1.6±0.3	3.6±0.4	43.6±14.9	35.7±1.9
Not added	1.5±1.3	3.3	43.9±15.3	36.9

* System A; Individual intestinal preparation vs. pooled gastric preparation

System B; Pooled intestinal preparation vs. individual gastric preparation

する物質が生成されるということもない。5) 2価イオンをあまり必要としない。

第2部 成長過程におけるビタミンB₁₂吸着機構の変化

成長過程のどの時期に内因子非依存型のビタミンB₁₂吸着から内因子依存型のビタミンB₁₂吸着へ移行するのか、そしてその時期においてこれら2つの型の吸着の相互関係はどうなっているのかという点について生後2日から40日ごろまでのシロネズミについて成熟シロネズミと対比させながら検討した。

第1節 内因子非依存のビタミンB₁₂吸着

小腸粘膜凍結乾燥標品10mgあたりの内因子非依存ビタミンB₁₂吸着量は図2に示すように生後20日ごろまでに直線的に減少して成熟レベルに至っている。

第2節 内因子依存のビタミンB₁₂吸着のための受容体の発達

内因子依存のビタミンB₁₂吸着のための受容体の発達を反映するところの、内因子添加時のビタミンB₁₂吸着量の増大量($\frac{u-c}{c} \times 100$)は図3のように生後20日ごろ成熟レベルに達している。

第3節 胃からの内因子分泌開始時期

胃粘膜抽出標品中の内因子活性は生後10日から20日ごろまで徐々に増大し、20日から30日にかけて急激な上昇をみせて成熟レベルに到達している(図4)。

第4節 胃、小腸両者を通じての内因子依存ビタミンB₁₂吸着能の変化

各時期のシロネズミに経口的に摂取されたビタミンB₁₂が胃を経て小腸へ下って行き、内因子の作用によって吸収されるという過程を反映するものとして、各時期の小腸のビタミンB₁₂吸着に対してその同じ時期の胃粘膜抽出標品がどの程度作用するかを調べた結果が図5である。生後20日から比較的なだらかに上昇し生後30日すぎに成熟レベルに達している。

要約 内因子非依存のビタミンB₁₂吸着量は生後20日ごろ成熟レベルにまで低下するが、この

Adsorption of vitamin B₁₂ to the intestinal mucosa preparations of the rats at various ages in the absence of intrinsic factor.

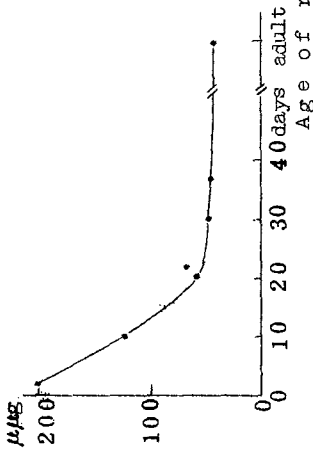


Fig.2 Adsorption of vitamin B₁₂ to the intestinal mucosa preparations of the rats at various ages in the absence of intrinsic factor.

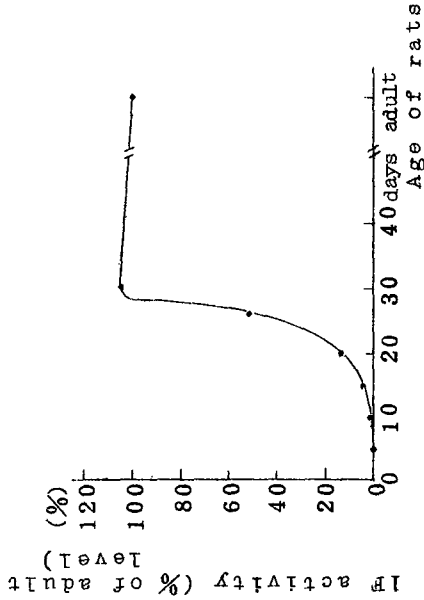


Fig.4 Intrinsic factor activities of the gastric mucosa extract of the rats at various ages.

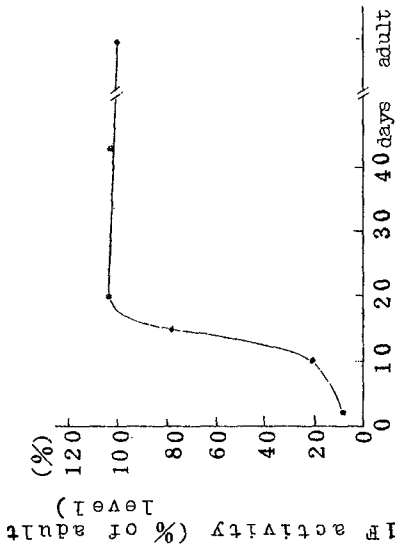


Fig.3 Intrinsic factor dependent vitamin B₁₂ adsorption to the intestinal preparations of the rats at various ages.

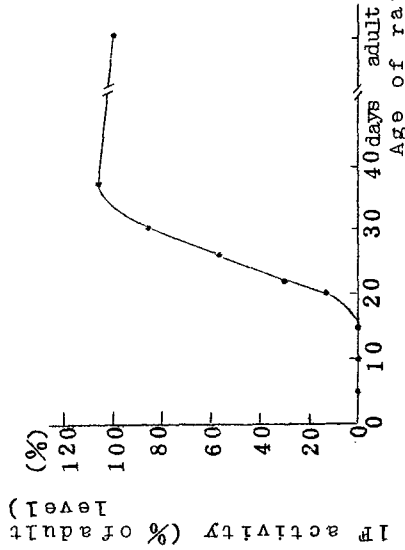


Fig.5 Intrinsic factor activities of the gastric mucosa extract of the rats at various ages on the intestinal preparations of the rats of respective same ages.

時期には内因子依存のビタミン B_{12} 吸着のための受容体は成熟レベルに達している。つまりこれら2つの機能は相補うような関係にあり、小腸側においては内因子依存のビタミン B_{12} 吸着機能は生後20日ごろ成熟レベルに達する。しかしながら胃における内因子生成能が成熟レベルに達するのは生後30日ごろである。胃、小腸を通じての内因子依存ビタミン B_{12} 吸収機構が成熟シロネズミのそれと同じになるのは生後30日前後と考えられる。胃、小腸の組織観察の結果、各細胞の分化、発達状況は上記のことをよく裏付けていた。

第3章 小腸以外の臓器によるビタミン B_{12} 吸着とそれに対する内因子の効果

ビタミン B_{12} は体内で内因子と似た性質をもっている担体と結合して血中を輸送され、臓器、組織に取り込まれる際、この担体が小腸における内因子と同様の役割を演ずると考えられている。そこで胃から分泌される内因子が臓器のビタミン B_{12} 吸着を促進するかどうか調べた。

第1節 胃から分泌される内因子の効果

腎臓ホモジネートへのビタミン B_{12} 吸着量は内因子の添加により著しく増大した。そしてEDTAによって脱着した(図6)。胎盤でも全く同様であった。

第2節 肝臓におけるビタミン B_{12} 吸着とそれに対する内因子の作用

肝臓においてはスライスでもホモジネートでもビタミン B_{12} 吸着に対する内因子の添加効果は明白でない。そこで肝臓ホモジネートを内因子添加時および無添加時にビタミン B_{12} とインキュベートした後、遠心分離してビタミン B_{12} の分布を小腸粘膜のばあいと比較した。結果は表3に示したとおりで小腸粘膜においては $1300\times g$ 沈でん区分で内因子添加によりビタミン B_{12} 吸着量が増すのに対し、肝臓ではむしろ減少した。

要約 胃から分泌される内因子が腎臓や胎盤のような体内臓器のビタミン B_{12} 吸着を促進するという興味ある知見が得られ、これもまた2価陽イオンを必要とすることがわかった。肝臓においては受容体があるとしてもそれは腎臓や胎盤とは異なった部分にあると思われる。

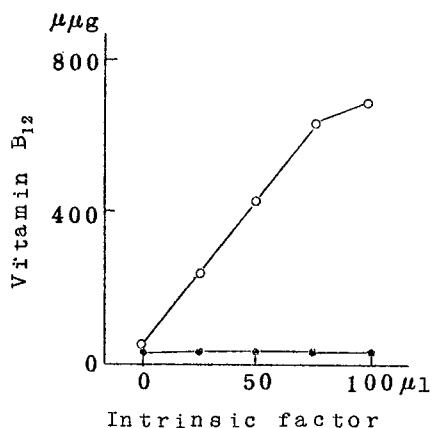


Fig.6 Effect of intrinsic factor on the adsorption of vitamin B_{12} to kidney homogenate.

Vitamin B_{12} adsorbed ○—○
 Vitamin B_{12} remaining after EDTA washing ●—●

Table 3. Distribution of vitamin B₁₂ in liver and intestinal homogenate after incubated with or without intrinsic factor.

Fraction	Liver		Intestine	
	Intrinsic factor added	not added	Intrinsic factor added	not added
1300×g ppt.	0.3%	0.7%	5.6%	3.3%
3500×g ppt.	0.1	0.3	2.7	2.1
6000×g ppt.	0.1	0.3	1.2	1.0
sup.	99.6	98.7	90.5	93.6

第4章 受容体の臓器特異性——とくに小腸と腎臓について

胃から分泌される内因子が小腸ばかりでなく腎臓や胎盤のビタミンB₁₂吸着を促進することがわかったが、ビタミンB₁₂-内因子複合体に対する受容体の性質が小腸と腎臓で異っているか、若干の検討を試みた。

第1節 幼若シロネズミにおける内因子依存性の臓器による差異

小腸では幼若期にはビタミンB₁₂の吸着は内因子により増大しないが、腎臓では生後24時間以内、生後5日という幼若期においても内因子によりビタミンB₁₂吸着は増大し、その増大率は成熟シロネズミにおけるのと同じ値であった(図7)。

要約 小腸では幼若期にはビタミンB₁₂吸着は内因子非依存であるのに腎臓では

じめから内因子依存である。また詳細は検討中であるが2価陽イオンの必要性が小腸と腎臓では多少異なるようである。

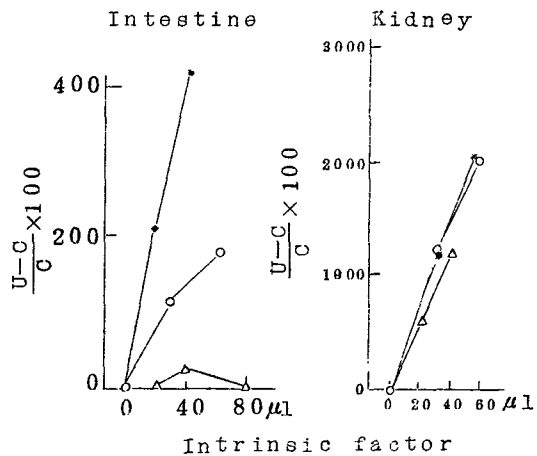


Fig.7 Difference in dependency on intrinsic factor between intestine and kidney in young rats.

Within 24 hours \triangle
5 days old \circ
Adult \bullet

第5章 内因子と受容体の間の種属特異性

胃から分泌される内因子が小腸以外の臓器においてもビタミンB₁₂の吸着増大効果があることがわかった。内因子と小腸の間では種属特異性があることが知られているが、内因子と腎臓や胎盤との間ではどうか検討した。

第1節 内因子と各臓器受容体間の種属特異性

表4に示すごとくモルモット各臓器においてモルモット内因子はもちろん、シロネズミ、ハツカネズミの内因子も有効であった。いっぽうモルモット内因子はモルモット各臓器に対してのみ有効であって、シロネズミやハツカネズミの各臓器には無効であった。シロネズミとハツカネズミの間に特異性はない。

Table 4. Species specificity between intrinsic factor and organs including intestine.

Receptor	Intrinsic factor source					
	Gastric mucosa extract			Gastric juice		
	Rat	Guinea pig	Mouse	Rat	Guinea pig	Mouse
Rat intestine	+++	-	++	++	-	
kidney	+++	-	+++	+++	-	
placenta	++	-	++			
Guinea pig						
intestine	++	++	+	+	+	
kidney	+++	+++	++	+++	+++	
Mouse						
intestine	++	-	++			
kidney	++	-	++			
placenta	+++		+++			

第2節 モルモットの受容体についての若干の検討

ビタミンB₁₂-モルモット内因子複合体とビタミンB₁₂-シロネズミ内因子複合体の両方が存在するばあいのモルモット受容体への吸着の様相を調べる目的で、一方の内因子には⁵⁷C₀標識ビタミンB₁₂を、他方には非放射性ビタミンB₁₂を結合させて⁵⁷C₀標識ビタミンB₁₂の吸着量を測定した。その結果モルモットの受容体はモルモット内因子とシロネズミ内因子に対して同じものであり、しかもこれら両者に対する受容性に順位はないと仮定した場合の理論値とほぼ一致する値が得られた(表5)。

Table 5. Unselectivity of guinea pig receptor for intrinsic factor of guinea pig and rat.

Organ	Adsorption reduced	
	experimental	theoretical
Guinea pig intestine (A)*	24.6%	26.7%
Guinea pig kidney (A)	47.6	50.0
Guinea pig kidney (B)	58.1	50.0

* (A): ⁵⁷C₀-vitamin B₁₂-guinea pig intrinsic factor and vitamin B₁₂-rat intrinsic factor.

(B): vitamin B₁₂-guinea pig intrinsic factor and ⁵⁷C₀ vitamin B₁₂-rat intrinsic factor.

要 約 従来内因子と小腸の間に知られていた種属特異性が内因子と他の臓器の間でも同様であることが明らかになった。モルモットの受容体はモルモット内因子とシロネズミ内因子に対して同じものであり、しかもこれら両者に対する受容性に順位はないことがわかった。

第6章 総 活

内因子の生理的意義および受容体の性質について検討をすすめることを明らかにした。

小腸粘膜への内因子依存ビタミン B_{12} 吸着能の分布は *in vivo* でのビタミン B_{12} 吸収能の分布とよく一致しており、この吸着が吸収の第一段階であることを示している。内因子依存ビタミン B_{12} 吸着は2価陽イオンを必要とするがエネルギーを必要としない。

幼若シロネズミ小腸におけるビタミン B_{12} 吸着は特殊な様相を呈している。すなわち、内因子非依存のビタミン B_{12} 吸着能が著しく大きい。そしてビタミン B_{12} 吸着量は内因子添加により増大せず、吸着に2価陽イオンを必要としない。この幼若期に特有の吸着能は生後20日ごろ失われ、このころから胃における内因子の生成能が増大しはじめ、生後30日ごろ胃、小腸を通じての内因子依存のビタミン B_{12} 吸収機能は成熟シロネズミにおけるものと同じになる。

胃の内因子はまた小腸以外にも腎臓、胎盤などの体内臓器においてもビタミン B_{12} 吸着を増大させる効果があることがわかった。そしてこれらのばあいにおいても2価陽イオンを必要とする。しかし小腸においては幼若期には内因子非依存のビタミン B_{12} 吸着が多いのに対し、腎臓でははじめから内因子依存であること、また小腸と腎臓では Ca^{++} と Mg^{++} の必要性はいくらか異っているらしいこと、などの差異がみとめられた。

従来、内因子と小腸の間に知られていた種属特異性が内因子と腎臓、胎盤の間にも同様にみられることがわかった。内因子と血中でビタミン B_{12} を結合している担体とは一部共通した構造をもつことが考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

人間を含めた多くの動物において、ビタミンB₁₂の腸管からの吸収には、胃粘膜で合成され、胃液に分泌される内因子という糖タンパクの介助を必要とすることが知られている。食物とともに摂取されたビタミンB₁₂は、胃で内因子と結合して複合体となって小腸のある特定の場所（リセプター）に達し、そこで吸収されるのである。しかしながらある動物種の内因子は同種の動物には有効であるが、他の動物種に必ずしも有効に働くとはいえず、いわゆる種属特異性のあることが知られている。なぜこのようなことになるかについて明らかな解答は得られていない現状である。

本研究はビタミンB₁₂の吸収の第一段階と考えられるビタミンB₁₂-内因子複合体の、小腸リセプターへの吸着という現象に集点をあわせ、内因子の栄養生理的意義および腸における吸収の作用機序の解明への手がかりを得る目的で行われたものである。

著者はまず①小腸粘膜における内因子依存のビタミンB₁₂吸着の性格について検討した。即ち、小腸粘膜への内因子依存ビタミンB₁₂吸着能の分布は、in vivoでのビタミンB₁₂吸収能の分布とよく一致しており、この吸着が吸収の第一段階であることを確めた。この場合、内因子依存のビタミンB₁₂吸着は、2価陽イオンを必要とするがエネルギーを必要としない反応であることをみた。②幼若シロネズミ小腸におけるビタミンB₁₂吸着能を、成熟期のそれと比較して検討しその特殊性を明らかにした。即ち内因子非依存のビタミンB₁₂吸着能が著しく大きく、内因子添加によっては殆ど増大することがなくこの吸着には2価の陽イオンを必要とせず、特に幼若期の胃から、幼若期の小腸に対してのみ特異的に作用する物質が生成されるということもないことを示した。これらの生后における経日的な変化を求めると、小腸における内因子非依存のビタミンB₁₂吸着能は、生后20日頃成熟動物レベルまで低下し、それを相補うように内因子依存の吸着能はこの時期に成熟レベルまで達する。一方、胃における内因子生成能が成熟レベルに達するのは、それより少し遅れ、生后30日頃であり、胃、小腸を通じて内因子依存のビタミンB₁₂吸収機構が成熟レベルになるのは、生后と考えられた。このことは組織学的観察によっても確められた。また、著者は③胃から分泌される内因子が、腎、胎盤などの体内臓器におけるビタミンB₁₂吸着を増大させる効果のあることを見出し、その実態を明らかにするための検討を行った。そしてこの吸着にも2価陽イオンが必要であること、しかし小腸においては、幼若期には内因子非依存の吸着が強いのに対し腎ではつねに日令に無関係に、内因子により吸着が増大することを明らかにした。これまで内因子と小腸の間に種属特異性があることが知られていたが、著者はさらに、④内因子と小腸以外の臓器との間にも同様の種属特異性のあることを明らかにした。このことは内因子と、血中でビタミンB₁₂と結合している担体（糖タンパク）とは一部共通した構造をもつ可能性を示唆するもので興味深い。以上本研究は、動物のビタミンB₁₂吸収に関する内因子の意義について比較栄養学的な探究を試み、いくつかの新知見を含むものであり、農学博士の学位を授与するに充分価値あるものと認める。