氏名・（本籍）	馬場春夫（東京都）
学位の種類	農学博士
学位記番号	農第17号
学位授与年月日	昭和41年10月13日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和22年9月 東京大学農学部卒業
学位論文題目	魚肝油ビタミンAの異性化と生物効力に関する研究
論文審査委員	教授（主査）土屋鈴彦 教授　中西武雄 教授　小柳達男

論文内容要旨

ビタミンAが発見されたのは、バターの有する特異な成長促進作用によるものであつた。

やがてそれはタラ他多くの魚肝油に著しく多く含まれることが見出されるにおよんで、研究は進みそれから結晶が得られ、さらに今日の合成ビタミンAが製造、市販されるに至るまでの発展を見たが、本邦では今日なお飼料用として魚肝油が多量輸出されている段階である。それのみでなく、食品強化用等としても魚肝油および鯨肝油の生産量は非常に大きく、分子蒸溜法によつて濃縮される分をも含めて、いわゆる天然ビタミンA油は、全ビタミンA消費量の70%をこえている状態である。

このような時一方で魚肝油中に種々のビタミンA異性体の存在することが、漸次明らかにされて今日では魚肝油の有するビタミンAの効力は単一成分によるものではないことが、ほぼ定説化されようとしている。

さらに具体的にいうとこれらの中でneo-aと称される2-mono-cis, iso-aと称される6-mono-cis, iso-bと称される2.6-di-cis型が、実際に魚肝油中に存在することが明らかとなつている。しかもこれらビタミンA異性体の生物効力がそれぞれ合成品について確かめられて、全トランス型を対照として、neo-a型75%、iso-aおよびb型22～24%という結果が得られている。

このような事実から、魚肝油中のビタミンAの理化学的定量法による測定値、すなわち吸光分析法や、Carr-Price反応を用いる比色分析法による測定値は、実際の生物効力との間に差を生じることとなり、結局魚肝油ビタミンAの理化学的定量値は、真の効力を示さないものとも考えられるようになつた。

魚肝油中に常に相当量のこれらビタミンA異性体が存在するなら、異性体の理化学的なレスポンスが、生物的なレスポンスを反映しなければ、当然その測定法に差異が生じる筈である。事実ここに主として問題とするビタミンA異性体の中でneo-a型iso-a、b型はCarr-Price反応では全トランス型と全く同じ100%のレスポンスを示し、吸光分析法でもneo-aで94%、iso-aおよびb型でも75%のレスポンスを示すのみなので、これら異性体の分布が顕著であれば、全トランス型を標準物質とする理化学的定量法による測定値は真の生物効力を示さないわけである。

また合成法によつて得られるビタミンAが全トランス型であるとすれば、この場合の測定値は測定法によつて差を生じないわけで、この測定値の信頼性に関して、魚肝油源のビタミンAと合成ビタミンAについての商業的な優劣も問題となつて来るわけである。

しかしながら著者は、魚肝油中のビタミンAシス-トランス異性体の分布は魚肝油ビタミンAの本来的な成分ではなく、全トランス型が大部分を占め、他の異性体は何らかの理由によつて全トランス型から異性化して生じたものであると考えた。したがつて合成ビタミンAにおいても異性化の程度によつては魚肝油と同様の異性体組成を生じ得るものと考えたのである。

そこでまずこれら魚肝油中ビタミンAの異性体の分布と、その生成過程を、無水マレイン酸とビタミンAの反応を用いる方法によつて検討し、且つその方法と理化学的定量法、生物効力との関連を求めた。ついでこの方法によつて魚肝油中ビタミンAの in vitro および in vivo の異性化を追求し、且つ合成品についてもこれを使つて比較検討した。そのためまず、無水マレイン酸とビタミンAの反応時間、反応による吸光度の変化をしらべ、そこに得られた条件によつて相当種類の魚鯨肝油および分子蒸溜魚肝油のマレイン価と相対生物効力を求め、その異性体分布を推定した。

また本分析法の迅速簡易化を検討して、在来の吸光分析法や赤外分析法とシス異性体分布との関連を求め、それらの方法の有効性の限界にふれ、実際に数種の魚肝油のビタミンA異性体をクロマトグラフ分析によつて分離確認を試みて、それの有効性を明らかにした。

またシロネズミ、ニワトリひなを用いて成長、肝中貯留試験を行なつて、マレイン価と相対生物効力との関連および実際的な飼料効果について、全トランス型との比較を行なつた。つぎに魚肝油中のビタミンAと、合成ビタミンAについて、その異性化に対する分子蒸溜、加熱、肝蔵成分、リン脂質、肝細胞顆粒成分の影響を検討した。また生体中におけるビタミンAの異性化を飼料中Aと、肝中A、脈管内における無水マレイン酸遅反応性ビタミンAについてしらべ、これらの結果より、魚肝油中ビタミンA異性体の由来、合成ビタミンAとの関連、それぞれの理化学的定量値の信頼性について明らかにした。以下それらについて得られたところを項目別に簡単に述べる。

1. 魚肝油および分子蒸留魚肝油ビタミンAの生物効力とビタミンAシス異性体の分布

ビタミンAと無水マレイン酸との反応条件を検討したところ、第1図および第2、3図のような結果が得られたので、入手し得た魚鯨肝油および分子蒸溜魚肝油について、無水マレイン酸反応を行なつて、Carr-Price 反応による回収試験によりマレイン価を求め、既往の推定式

$$RP=995-0.2\,(MV)-0.051\,(MV)^2+0.000768\,(MV)^3$$

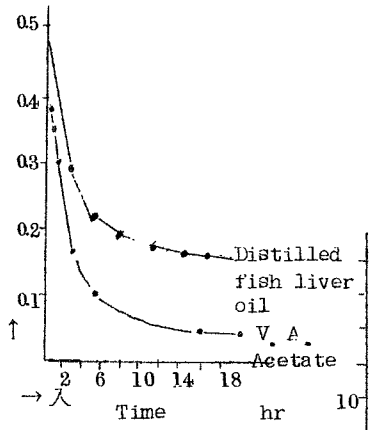
RP……相対生物効力

MV・・・・・マレイン価

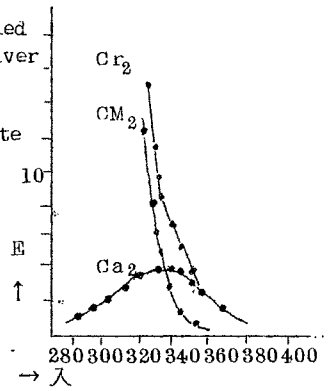
を適用して、相対生物効力の推定値を求めたところ、第1表のように魚種、肝油の工程等に関係なく、マレイン価にして79%ないし44%、相対生物効力にして92%ないし52%であつた。この方法を簡易化および迅速化するため、酸化操作を省いたり、反応温度を55℃迄高めて、反応速度を上げることを試みたたが、いわゆる全油法によると、アルコール型、エステル型の分布状態が、一様でないためか、測定値の一致が見られず（第2表）採用は行なえなかつたが、反応温度の上昇については第4図のとおりで、迅速化すなわち標準法16時間に対して高温法55時間が可能となつた。

ここに得られた測定値は、既往文献にある測定値とほぼ近似した結果であるが、ややシス異性体分布の少い傾向が見られ、少数ではあるが、殆ど全トランス型と考えられる魚肝油さえもあつた。

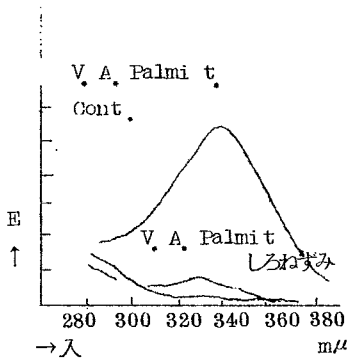
全トランス型ビタミンAが殆と全体を占めるような、魚肝油の存在は、他の異性体がこれの異性化によつて生ずることを示唆するものである。



第1図　ビタミンAと無水マレイン酸の反応とC. P. 反応



第2図　無水マレイン酸ビタミンA、ベンゾール溶液の吸光曲線



第3図　ビタミンAと無水マレイン酸の反応による吸光曲線の変化

第1表　魚肝油ビタミンAのマレイン価
および推定生物効力

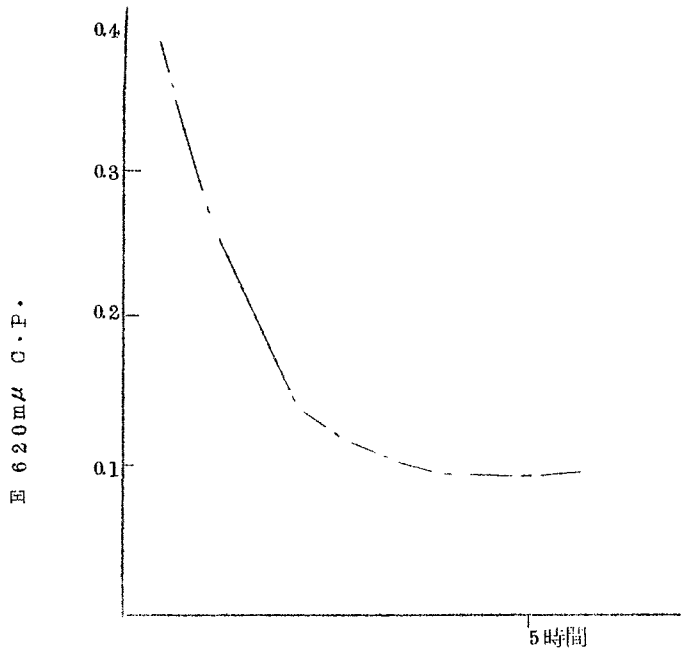
試料肝油	吸光法によるビタミンA値	Carr—Price法によるビタミンA値	マレイン価	※相対生物効力	生物効力
	I.U.	I.U.		%	I.U.
混合油	1,150,000	1,250,000	8.8	91.3	1,140,000
〃	519,000	581,000	24.8	75.2	436,000
〃	475,000	522,000	7.9	92.1	480,000
スケトオダラ	223,000	233,000	31.1	68.9	160,000
〃	221,000	260,000	29.1	71.0	184,000
混合油	215,000	241,000	29.7	70.3	169,000
〃	115,000	129,000	30.8	70.0	90,200
〃	107,000	109,500	23.5	76.5	83,400
オヒヨウ	64,900	67,400	32.1	67.9	45,600
サメ	11,400	14,020	38.9	61.0	8,680
クジラ	62,200	68,100	29	71	48,350
ミンタイ	12,500	13,700	44	52	7,120
スケトオダラ	4,900	5,450	38	62	4,460
〃	8,050	8,250	34	66	5,445
アブラザメ	5,550	5,750	40	62	3,565
スケトオダラ	6,200	6,000	33	67	4,020
〃 蒸溜油	215,000	218,000	33	67	146,000
〃	207,000	272,000	31	69	187,680
クジラ蒸溜油	462,000	507,000	37	63	319,400
アブラザメ	215,000	234,000	31	69	161,460

※　全トランスビタミンAの生物効力に対する%

裂2表　全油法でえたマレイン価

試料	全油法			ケン化法	
	CP値	MV	RP	MV	RP
ビタミンAパルミテート	852,000	9	95	7	96
魚肝油	68,100	28	72	22	80
〃	272,000	30	70	25	76
〃	12,600	31	69	29	71

全油法におけるMV＝$\frac{R-2}{91.2}$として計算した。

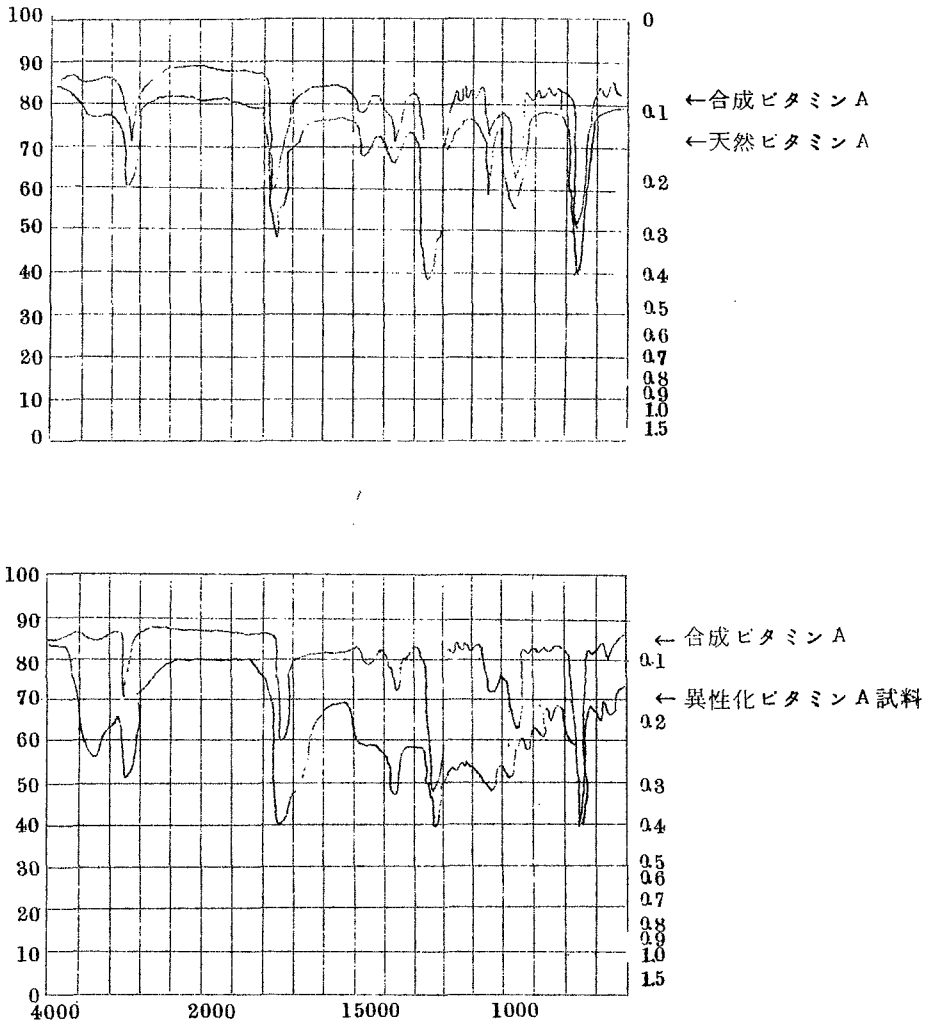


第4図　55℃における無水マイレン酸とビタミンAの反応

2. 魚肝油ビタミンAのマレイン価による生物効力推定と他の理化学的分析法について

以上無水マレイン酸反応を用いることによつて魚肝油中ビタミンAには、相当量のシス異性体の含まれることが明らかとなつたわけであるが、これが他の分析法すなわち赤外分析法、クロマトグラフ法、その他現在もつとも広く行なわれている吸光分析法による時、如何なる結果が得られるかをしらべようとした。それと共にまたシス異性体を分離して、その分画段階と、この反応との間の関連性について検討を加え、本法の有効性についてその確実性を明らかにした。

まづ魚肝油源ビタミンAアセテート結晶およびその異性化試料と、合成ビタミンA結晶について、フイルム法、島津IR－27による赤外分光分析を行なつたところ、第5図のような結果を得たが、極端に異性化した試料以外は、シス異性体について知られているピークが認められなかつた。さらにこれによつて分解能の大きな分光器が必要であること、および高純度標品ならびに試料を必要とすることが明らかとなつた。すなわち一般的なシス異性体存在の試験法としては採用し難いことが明らかとなつた。



第5図　赤外吸光曲線の重ね合せによる比較

吸光分析法との関連については、吸光比、f値、直接換算係数（補正省略）、吸光曲線を数種の魚肝油について求めたところ第6図および第3～4表のとおりとなつた。

第3表　魚肝油ビタミンAの吸光性とマレイン価

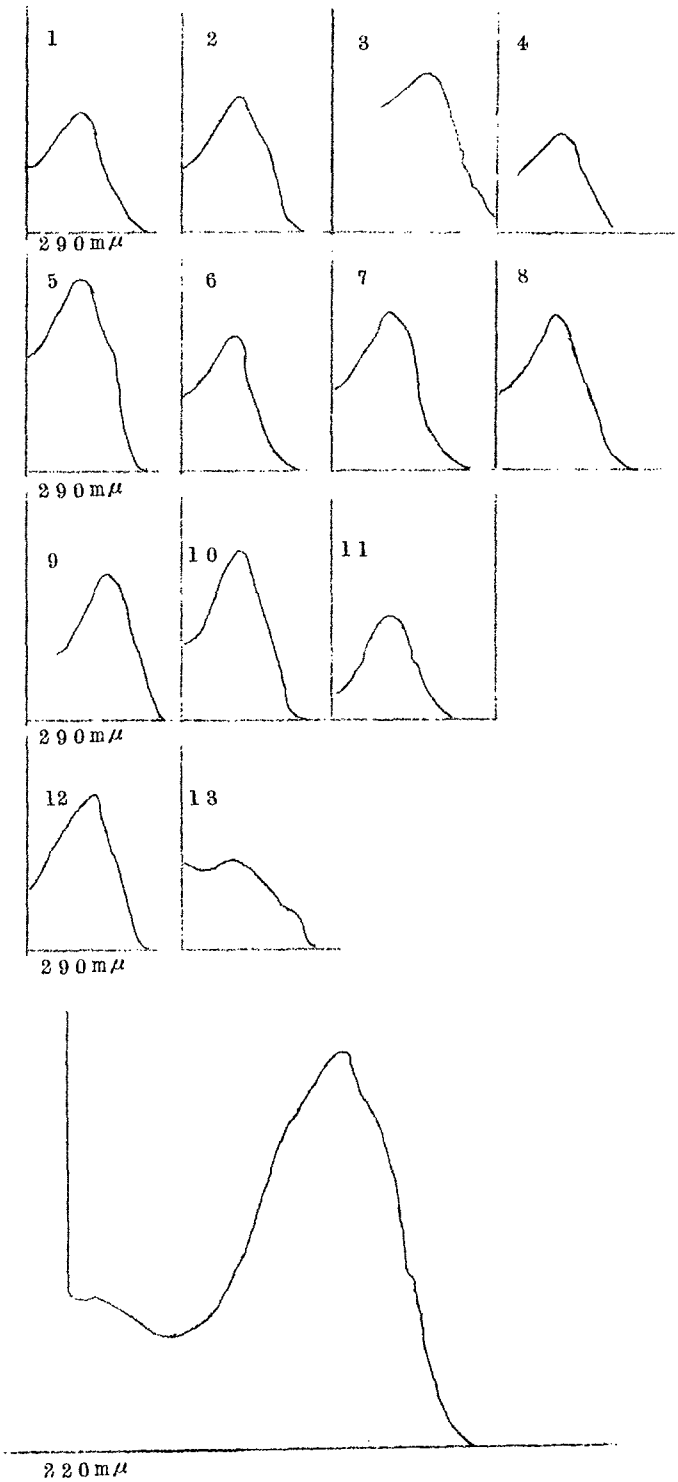
試料	吸光法によるビタミンA値	カールプライス法によるビタミンA値	f値	マレイン価	相対生物効力	推定生物効力	
	I.U.	I.U.			%	I.U.	
魚肝油	430,000	450,000	0.906	8.75	92.0	414,000	
〃	1,005,000	1,095,000	0.750	15.89	84.0	918,000	
〃	8,650	10,680	0.786	38.90	61.0	6,500	
〃	52,800	55,000	0.754	32.10	68.0	37,400	
〃	184,000	193,000	0.812	31.10	69.0	13,300	
〃	89,200	99,500	0.765	30.80	70.0	69,500	
〃	414,000	464,000	0.816	24.80	75.2	348,000	
〃	88,000	90,100	0.816	23.50	76.5	68,700	
〃	176,000	207,000	0.752	29.10	71.0	146,500	
〃	172,000	192,500	0.763	29.70	70.3	135,000	
結晶	2,500,000	2,570,000	0.892	2.40	97.6	2,490,000	合成
〃	2,610,000	2,670,000	0.885	2.40	97.6	2,590,000	魚肝油
〃	98,700	93,500	0.425	30.80	69.2	63,400	〃

第4表　魚肝油とビタミンAの吸光分析とマレイン価

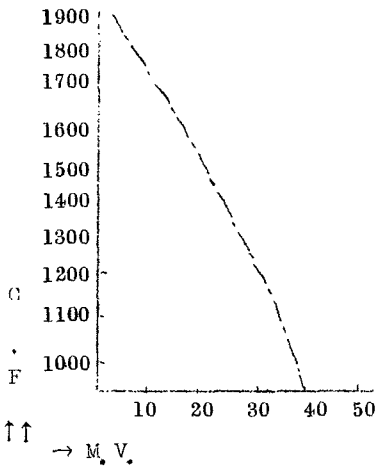
試料No.	マレイン価	f　値	300R	350R	
1	8.8	0.906	0.6349	0.4920	
2	15.9	0.7504	0.6190	0.5357	
3	38.9	0.7860	0.7194	0.5611	
4	32.1	0.7547	0.6602	0.5233	
5	31.1	0.812	0.6415	0.4989	
6	30.8	0.7653	0.6433	0.5304	
7	24.8	0.816	0.640	0.467	
8	23.5	0.816	0.689	0.474	
9	29.1	0.752	0.633	0.517	
10	29.7	0.763	0.677	0.5104	
11	2.4	0.892	0.577	0.4872	結晶合成A
12	2.4	0.885	0.6024	0.5120	結晶天然A
13	3.8	0.425	0.9864	0.5254	結晶放置

吸光曲線は一般に吸光分析の範囲においては勿論、シスピークの期待される波長範囲においても、試料ビタミンAの異性化のレベルを示していない。吸光比、f値も、特にマレイン価との関連は著しくないが、極端な場合やや異性化のレベルと平行関係が見られている。いずれにしても吸光分析法は、Carr-Price 法にくらべれば、補正法によつてビタミンAの真の値に近い結果を示すことはいう迄もないが、異性化の程度の少いもので、マレイン価が10以下のものでは必要以上の補正が行なわれることが予想される。また直接換算係数とマレイン価の間の関係（第7図）にもこのことは明らかで現行の1830と、一時使用された1600はそれぞれ、マレイン価にして7および20であり、それぞれ全トランス型と異性化試料にあてはまる。

つぎにクロマトグラフ法による分析法は、吸光分析法の前処理法として、ビタミンA以外の夾雑吸収を除去するために種々行なわれる所であるが、魚肝油中



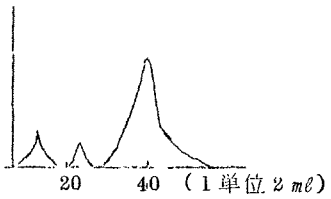
第6図　各種魚肝油ビタミンAのUV吸光曲線



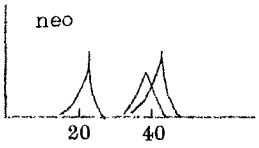
第7図　換算係数とマイレン価の関係

ビタミンAのシス異性体はneo－a　型についてのみ報告が見られる程度で他はない。また著者が用いた無水マレイン酸による異性体分布の推定法は、これら異性体の反応立体特異性を理論的根拠としているので、実際に存在する異性体と、この反応との関連を証明する必要があるので、これら異性体の存在の確認のためにクロマトグラフ法を行なつたのである。

これらの結果は第8～10図に示したとおりである。すなわちneo－a型とiso－a型の存在を認めた。かつiso－b型の存在の推定を行なうことが出来た（第5表、第11図）。また異性化の程度によるこれら異性体分布の推移も異性化の程度が低い時には、むしろneo－a型が著しく、異性化が著しくなるとiso－aおよびb型がふえることも明らかにすることが出来た。

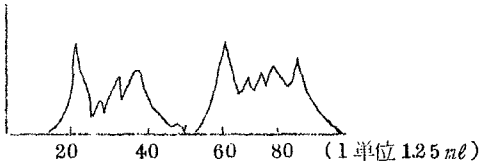


さめ肝油ビタミンA
カラムクロマトグラム（リン酸　カルシウムカラム）
MV　38

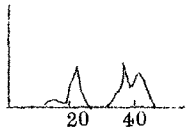


ビタミンA標品のカラムクロマトグラム
（リン酸2カルシウムカラム）

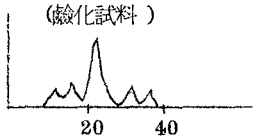
第8図　リン酸2カルシウムによる
クロマトグラフ



さめ肝油ビタミンAクロマトグラム
（アルミナカラム　2回連続使用→再現性試験）

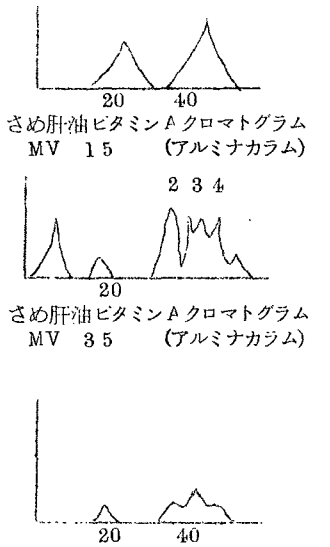


魚肝油ビタミンAアセテート結晶クロマトグラム
（酸化試料）

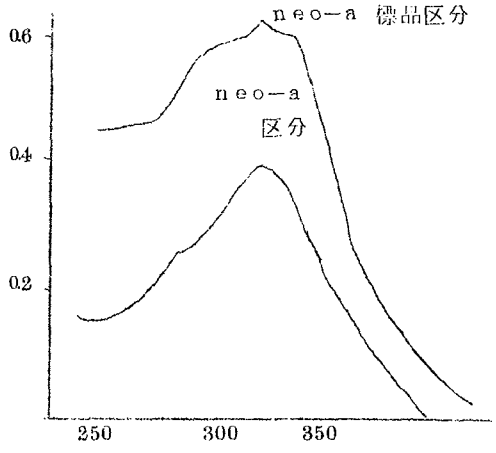


13 シスビタミンA　合成結晶
（neo－a）　異性化試料

第9図　アルミナによるクロマトグラフ



第10図 アルミナによるクロマトグラフ



第11図 neo-aの標品およびクロマトに分離された区分の吸光曲線

第5表 クロマトグラム各区分のC. P. 反応と紫外部極大吸収の吸光比

fraction	E 620 mu·C·P·/EU·V·max 推定異性体	reference value
peak1	1.07 neo-a	1.08
peak2	1.13	—
peak3	1.15 iso-b	1.15
peak4	1.00 all-tr.	1.00

これらの結果から、理化学定量法、特に吸光分析法で得た値も、魚肝油中ビタミンAの相対生物効力が78%以上の推定値、すなわちマレイン価が20%以下の場合には、充分真のビタミンA効力を示すことを証明した。

3. 魚肝油ビタミンA生物効力のマレイン価による推定と生物学的試験

著者が前述のようにいくつかの魚肝油試料についてビタミンAのマレイン価を求め、これまでに提出されている推定方式にしたがつてビタミンAの相対生物効力を算定し

たが、ここに用いたのは水性綜合剤中のビタミンAの異性化実験と、シロネズミ肝臓中に貯えられるビタミンAの回収実験から、統計学的に得られたものである。しかしながらビタミンAの生物効力として期待されるものには理論的にはともかくとして、実際的には成長効果が大きく、それは飼料強化を考える場合に特に意義があると思われる。

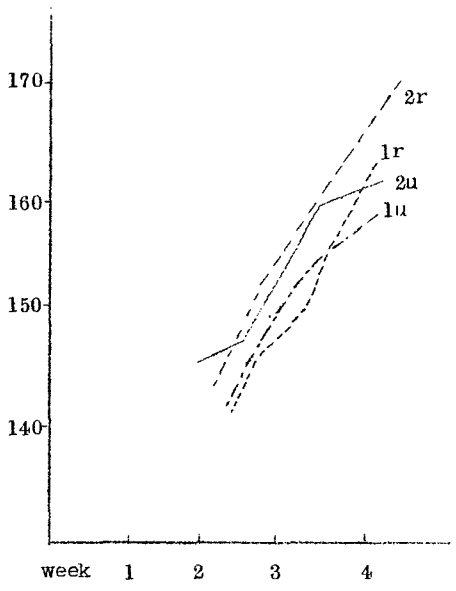
また魚肝油中ビタミンAと水中拡散型のビタミンAとその異性化様式と異なることも考えることが出来る。これらの点を考慮して、まずシロネズミの成長試験、肝中貯留試験を行なつた。つぎにシロネズミとはビタミンAシス異性体の生物学的レスポンスの異なることが知られているニワトリひなの成長ならびに肝中貯留試験を行なつて、マレイン価と生物効果との間の関係を検討した。これらの結果は第6表～16表、第12図～19図に示すとおりで、一般的に生物試験によつて求めたビタミンA効力の方が大きく、推定式によつて得た効力は最小3%、最大56%の差異を生じた。特に成長試験との開きは大きく、ニワトリひなではこの差異が著しいので、この推定方式によると魚肝油中のビタミンA効力を過少に評価することとなる。そこで著者の測定値を用いて、最少自乗法によつて推定式を求めると、

$$RP = 101.6 - MV \times 0.7647$$

のようになり、既往の方式と、異性化の程度の低い場合に、ほぼ近似を示す。しかし異性化の程度が大きい場合には10%前後の差異を生ずる。

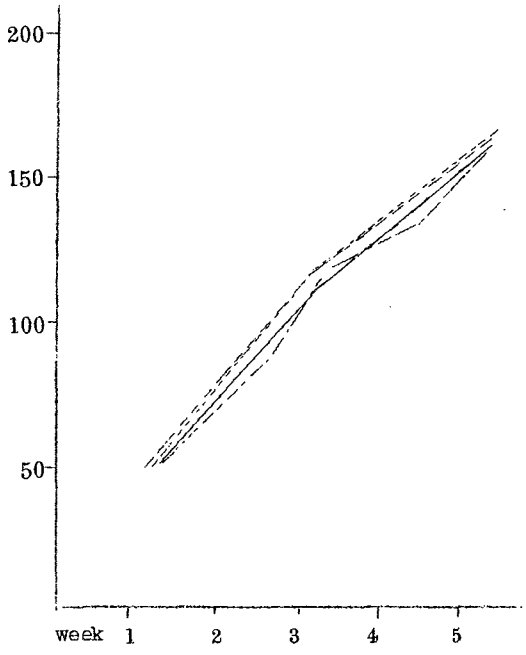
ニワトリのビタミンA肝中貯留はシス異性体では、シロネズミより著しく劣ることが知られているが、魚肝油中のビタミンAではマイレン価25の試料で、全トランス型に対して、成長効力を100%の場合、肝中貯留42%、成長所要量（肝臓中よりの消費）で83%となる。したがつて魚肝油中のビタミンAの効力をニワトリひなを用いて、肝中貯留法によつて測定すると、理化学定量値とは勿論、おそらく真の生物効力とも相当の差異を生ずるものと思われる。しかしながら成長効果については特に差が見られないので、生物学的定量法についても、使用動物種、測定方法に吟味が必要である。

以上のことから、シロネズミ、ニワトリひな、いずれについても、魚肝油中ビタミンAの成長効果は、一般の投与量において、全トランス型とかわらないといえる。た



註 各群 10匹
vitamin A 1 I.U.
2 I.U. 1日1匹当り

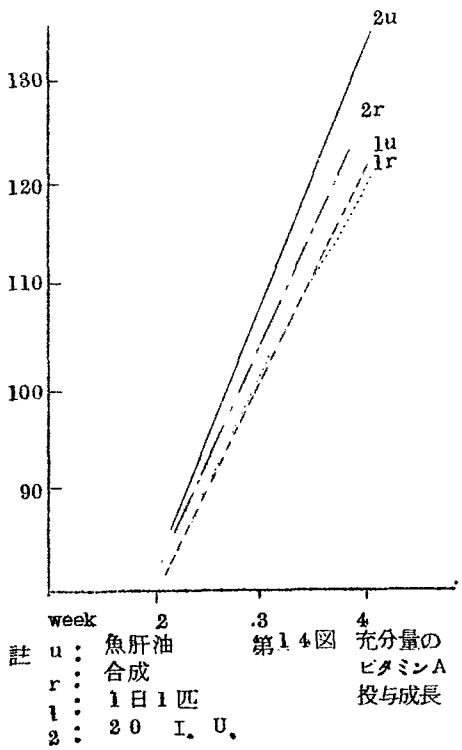
第12図 ビタミンA欠乏シロネズミの成長試験



第13図 欠乏期省略ビタミンA投与
シロネズミの成長

第6表 シロネズミの成長とビタミンAの相対生物効力

実験群		全増重量 g／week	相対生物効力推定値
合成 vitamin A Palmitate	1r	99.9	100%
	2r	133.3	
魚肝油	1u	104.7	72
	2u	121.4	
相対生物効力			80%



註 u：魚肝油
r：合成
1：1日1匹
2：20 I.U.

第14図 充分量のビタミンA投与成長

第7表　肝中貯留ビタミンAとマレイン価
(1)

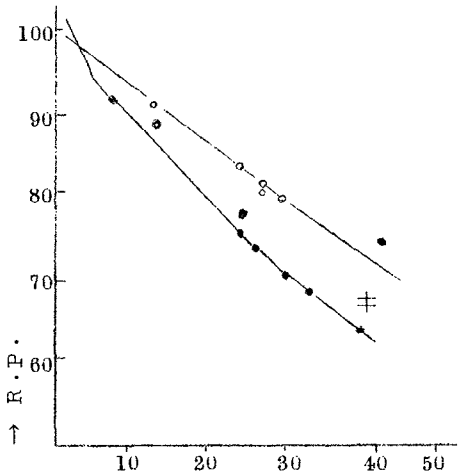
実験群		肝中ビタミンA	推定相対生物効力
合　成	1r	482I.U.	97%
vitamin A	2r	1,248	
魚肝油	1u	397	74
	2u	1,013	
	相対生物効力		82.7%

註：1日1匹当り、　500I.U.・・・・1000I.U.
全投与量1匹当り 1500I.U.・・・3000I.U.

第8表　肝中貯留ビタミンAとマレイン価
(2)

実験群		肝中ビタミンA	推定相対生物効力
合　成	1r	835I.U.	97%
vitamin A	2r	2736	
魚肝油	1u	660	74
	2u	2029	
	相対生物効力		81.0%

註：1日1匹当り、　100I.U.・・・200I.U.
全投与量1匹当り　500I.U.・・・1000I.U.



＊(%)　RP＝10.16－MV×0.764 (BABA)

第15図　マレイン価と相対生物効力の関係

第9表　シロネズミの成長による魚肝油ビタミンA効力(1)
試料のマレイン価3.3　推定RP＝68

	A投与量 (I.U./日)	動物数	週当り増重量合計	
1r	1	10	60.1 (ar)	全トランス型ビタミンA群
2r	2	〃	101.2 (br)	
1u	1	〃	46.6 (au)	魚肝油群
2u	2	〃	71.6 (bu)	

RP%＝71.0
定量誤差±19.1%

第１０表　シロネズミの成長による魚肝油ビタミンＡの効力

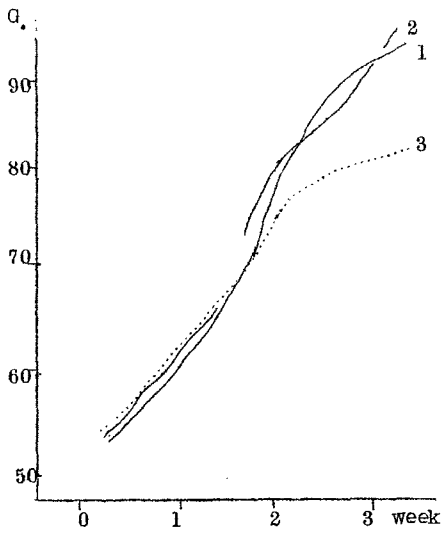
試料のマレイン価２６　　推定ＲＰ＝７５

	Ａ投与量 (I・U・／日)	動物数	週当り増重量合計	
1r	2.5	10	133.8	全トランス型ビタミンＡ群
2r	5	〃	251.0	
1u	2.5	〃	117.6	魚肝油群
2u	5	〃	245.7	

実験結果１と同様にして

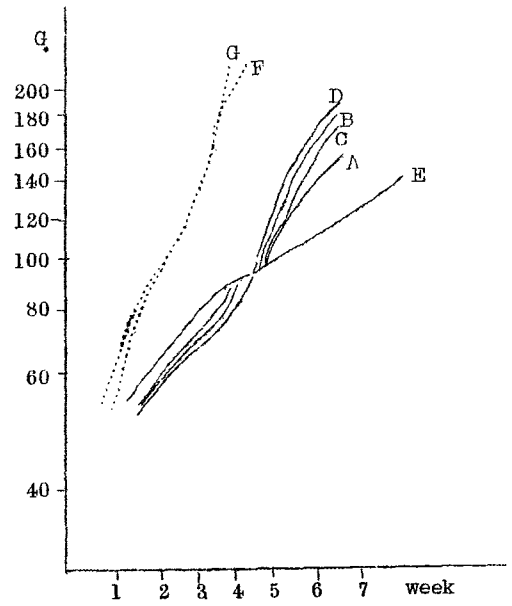
ＲＰ％＝９３９

定量誤差±１２.３％



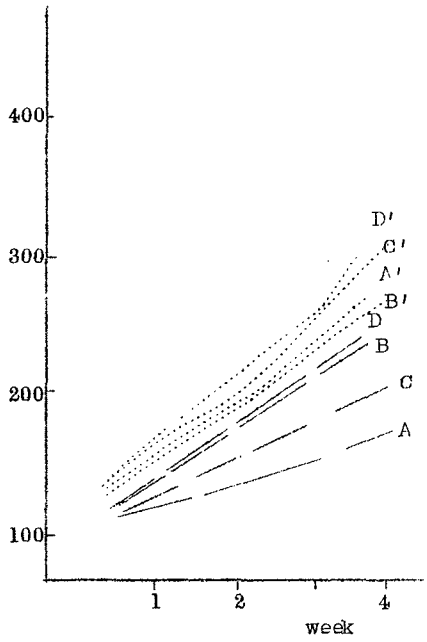
１日当り　10 I.U. 投与　3は投与せず。
１群　#634　　２群　#602

第１６図　ビタミンＡの限界投与予備試験
におけるひなの成長曲線



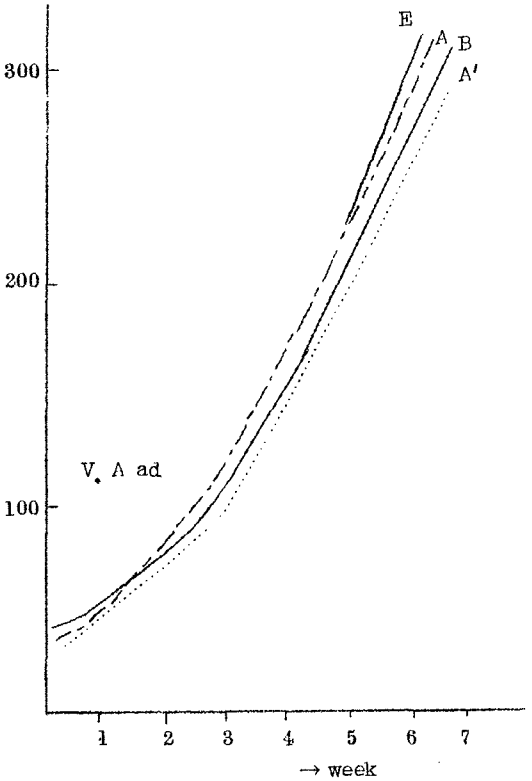
F・A・Cは合成ビタミンＡアセテート・　G.B.
Dは魚肝油、１日当りF.G.は50I.U.　A.B.は
125 I.U.　Dは25 I.U.投与，Eは対照
魚肝油は試料番号503

第１７図　ビタミンＡの２段階限界投与試験(1)
におけるひなの成長曲線



ビタミンA源および投与量はFig 2と同じ。
……はセラチン 10% 添加
———はA定量用飼料

第18図 ビタミンAの2段階限界投与試験(2)におけるひなの成長曲線



すべての実験群がEとNの間に入るので他は省略した。
魚肝油は試料番号601

第19図 ビタミンAの十分投与によるひなの成長曲線

第11表 ビタミンA 2段階限界投与によるニワトリひなの成長試験(2)

実験群	体重 g	増重量／週g	増重率／週%	飼料効率	たんぱく効率
A'	185±4.2	42.2	29.6 ±4.8	3.6	0.96
C'	193±4.3	47.0	32.2 ±4.2	2.7	0.72
B'	186±8.1	37.0	24.8 ±4.1	2.9	0.76
D'	203±5.3	52.5	34.8 ±5.8	2.9	0.76
A	133.5±9.2	14.3	12.2 ±2.4	6.2	1.14
C	145.0±8.5	29.0	23.7 ±1.6	5.8	0.67
B	162.1±15.7	33.6	20.8 ±1.9	3.7	1.08
D	174.1±10.3	31.7	22.3 ±0.52	3.3	0.66

5%の危険率で有意の差 'をつけた実験群は飼料中にゼラチンを添加した。

第12表　飼料による成長効果の変化率

実験群	ビタミンA投与量／日	増重量の変化率	増重率の変化率
A — 合成	12.5	1.51	2.47
B — 天然	〃	1.12	1.35
C — 合成	25.0	1.56	1.55
D — 天然	〃	1.12	1.63

第13表　ビタミンA十分投与によるニワトリの成長試験

実験群	体重 g	増重量 g	増重率 %	飼料効率＊	たんぱく効率＊＊
A	283±12	624	300±1.5	2.7	0.80
A′	260±19	590	305±3.7	2.5	0.74
B	274±14	646	304±1.7	2.4	0.71
B′	272±12	603	239±3.2	2.4	0.71
C	280± 5	454	219±1.3	2.3	0.48
C′	256±12	564	268±1.5	2.6	0.55
D	277± 7	461	257±2.1	2.2	0.46
D′	264±17	660	252±2.2	2.3	0.48
E	295±22	630	338±3.8	2.1	0.44

＊　増重1gに要する飼料g　　＊＊　増重1gに要する飼料中のたんぱく質量g

A：1日1羽当り　50国際単位の合成ビタミンAアセテートを投与
A′：同じく　100　〃
B：同じく　50　の魚肝油ビタミンAを投与
B′：同じく　100　〃
C：飼料中に魚肝油ビタミンAをNRCレベルに添加、さらに
　1日1羽当り100国際単位の合成ビタミンAアセテートを投与
C′：同じく　200　〃
D：同じく　100　の魚肝油ビタミンAを投与
D′：同じく　200　〃
E：同じく　ビタミンAは経口投与せず。

第14表　試料としたビタミンA源

試料番号	634	601	602	503
製品別	合成アセテート	抽出油	蒸溜油	蒸溜油
吸光法（光局XVI）によるビタミンA I.U./g	1,074,000	673,000	173,000	98,000
マレイン価による推定生物効力%	984	950	787	754

第15表　ビタミンA限界投与予備
試験におけるひなの成長

実験群	体重 g	増重量 g	飼料効率
1	88.78±2.82	47.0	3.5
2	88.06±3.92	42.3	4.1
3	79.08±3.12	36.3	5.5

第16表　ビタミンA2段階限界投与によるニワトリひなの成長試験(1)

実験群	体重 g	増重量／週 g	増重量 %	飼料効率	たんぱく効率
A	100.0±7.6	20.21	24.6±2.4	3.2	0.55
C	101.8±7.1	22.16	27.5±1.9	2.4	0.39
B	110.4±7.3	24.44	28.2±1.4	2.1	0.30
D	110.0±5.6	27.72	31.4±1.7	2.3	0.38
E	77.0±9.6	9.30	13.9±3.3	4.3	0.79
F	271.7±9.5	79.75	29.3±1.7	3.5	0.74
G	273.7±9.6	80.50	29.4±4.9	2.9	0.63

だしニワトリひなについてはNRC所要量もしくはその半量以上の場合には、むしろ魚肝油をビタミンA源とした場合の方が成長がすぐれていたし、またNRC所要量以上の投与では、ビタミンA源に関係がなく、充分量投与の意義が認められないことがわかつた。

またニワトリひなの、魚肝油中ビタミンAの成長効果と合成ビタミンAとの差の、ある魚肝油における場合の有意性から、魚肝油中に何らかの成長因子の存在が考えられるが、これがまた、肝中貯留効果との間の差に起因するものと思われる。

4. in vitro における魚肝油ビタミンAの異性化について

数種の魚肝油試料についてのビタミンAのマレイン価の検討、シロネズミおよび、ニワトリひなの生物試験の結果とマレイン価との関連の検討によつて、魚肝油中ビタミンAの相対生物効力が、ある場合には全トランス型に匹敵し、他の場合には70%もしくはそれ以下の効力しか示さないことを認めたが、この異同が魚肝油中のビタミンAの異性化によるものと考えられたので、マレイン価の測定法を用いて分子蒸留の

第17表　分子蒸溜による魚肝油中ビタミンAの異性化

試　料		CP法によるビタミンA値	マレイン価	比生物効力
	※	I.U.		%
生肝油	1	13,500	12	91
〃	2	9,000	18	85
〃	3	8,500	14	89
蒸溜油	1	272,000	22	80
〃	2	68,100	25	76
〃	3	218,000	33	67

※　できるだけ新鮮な肝油を試料とした。採油直後ないし1カ月以内と考えられる。

第18表　マグロ、シロネズミ V.A. の異性化

シロネズミ肝臓

No.	マレイン価	相対生物効力
1	5.9	97
2	10.0	94
3	23.6	78
4	28.1	72

マグロ肝臓

No.	マレイン価	相対生物効力
1	10.9	92
2	10.6	92
3	17.0	86
4	19.0	83

1：control
2：100℃ 15min
3：100℃ 15min 37℃ 48hr
4：37℃ 48hr

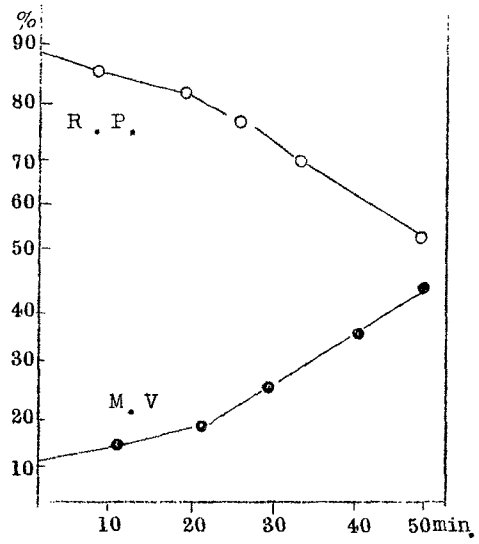
第19表　ビタミンAの異性化に対するマグロ肝臓組織の影響

No.	実　験　条　件	マレイン価	相対生物効力
1	−20℃ 48 hr	8.8	95
2	150℃ 30 min	26.0	74
3	without tissue 150℃ 30min with water	10.0	94
4	control	9.5	95
5	240℃ 15min	41.0	58
6	without tissue 240 ℃15min	10.2	94
7	37℃ 48hr	17.2	86
8	without tissue 37 ℃48hr with water	5.0	98

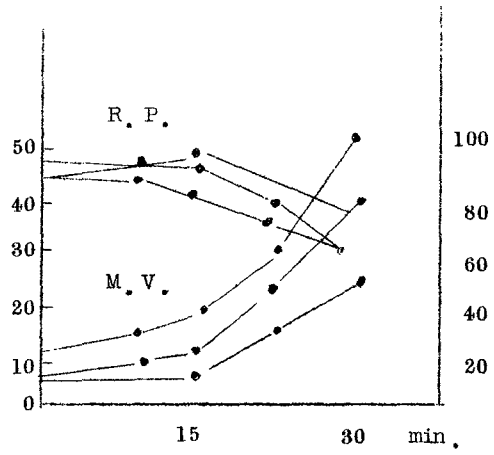
第20表　V. Aの異性化に影響する二三の成分

Substance	150℃ 30min	37℃ 48hr
＊ albumin	4.5	2.3
＊ glucose	7.1	2.2
＊ casein	5.7	3.8
＊ tween 80	4.2	2.6
＊ blood (rat)	15.2	6.0
＊ control	7.7	1.6
＊＊ EDTA	—	10.2

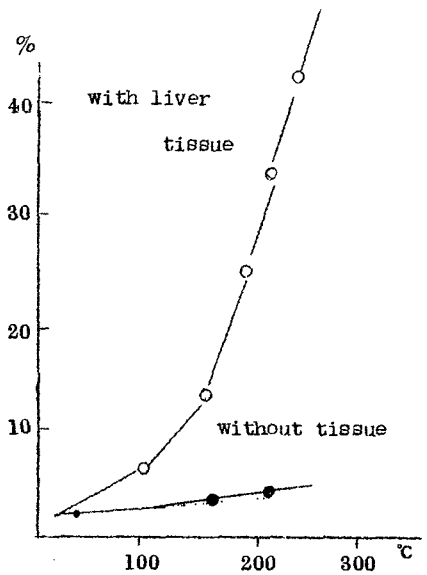
＊　試料油の50倍
＊＊　0.01% 液



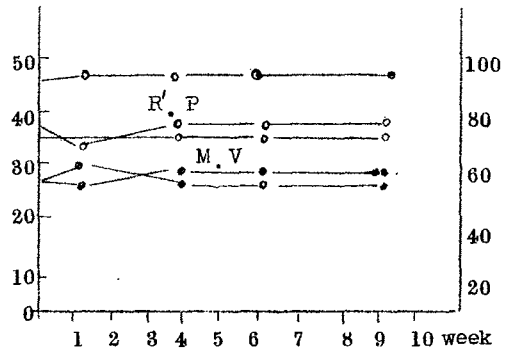
第２０図　１５０℃におけるV. A異性化



第２１図　２４０℃におけるV. Aの異性化



第２２図　肝組織とV. Aの異性化



第２３図　精製魚肝油の貯蔵とV. Aの異性化

第21表　シロネズミ肝臓ホモジエネート中におけるビタミンAの異性化

試　　料	条　　件	マレイン価	R　P
肝ホモジエネート	37℃　48hr	15.6	87
〃　対照 〃	0hr	1.86	99
肝ホモジエネート＋SRI	37℃　48hr	31.7	68
〃　対照	0hr	67.5	(55.5)

第22表　魚肝臓および抽出油中ビタミンAの異性化☆

試　　験　　区	温　度（℃） 5	25	37	
＊　liver homogenate	3.0	10.0	15.2	マレイン価
＊＊　〃	2.5	10.7	18.0	
＊　extracted oil	2.4	3.2	4.0	
＊＊　〃	2.4	4.0	5.4	

＊　かつを
＊＊　まぐろ
☆　48時間

第23表　リン脂質のビタミンA異性化におよぼす影響

レ　シ　チ　ン	マレイン価
soy lecithin	29.0
egg lecithin	28.5
soy lecithin with starch	29.0
〃 with albumin	31.2
〃 with liver homo.	32.0
liver homogenate	32.0

第24表　肝細顆粒区分のビタミンA異性化におぼす影響

（しろねずみ肝）

区　　分	マ レ イ ン 価	
mitochondria	34.5	17.2
上　清	13.2	5.0
liver homogenate	29.0	14.0
（まぐろ 肝）		
mitochondria	33.0	—
上　清	12.0	—
liver homogenate	29.0	—

影響および種々の物質について、種々の条件下で異性化の状態を検討、かつ異性化の要因を追究した。この結果は第２０～２３図および第１７～２４表に示すとおりである。

加熱による異性化は分子蒸溜などによる処理条件を考えて、１５０℃および２４０℃における異性化を観察した所、魚肝油中の異性化は予期した程著しくなく、２４０℃、３０分において漸く全ビタミンＡの５０％が異性化する程度であつた。

肝臓組織の影響は、ビタミンＡを充分含む魚肝臓およびシロネズミの肝臓のホモジネートおよび、肝ホモジネートに魚肝油ビタミンＡを添加した場合の観察によつて検討し、熱処理のいかんによらず異性化の速度は、肝臓組織が存在すると、対照にくらべて５倍となり、非常に影響の著しいことを見た。しかし酵素的異性化は、前処理加熱の有無による差の少いところから、著しくないことを明らかにした。

また凍結における魚肝臓中ビタミンＡの異性化は殆ど生じないこともまた明らかにした。

つぎに異性化に著しい影響をおよぼす成分としては、カゼイン、アルブミン、ぶどう糖などは影響がなく、ＥＤＴＡおよびシロネズミの血液によつて、やや促進されることを見た。

肝臓組織と血液の異性化効果が大きいのでその共通成分として、リン脂質および肝細胞の顆粒区分について、異性化の影響を検討した所、大豆レシチン、卵レシチン共に、効果が著しく、肝ホモジエネートに準ずるものが見られた。またマグロおよびシロネズミ肝臓のミトコンドリヤ区分は、上清区分に比較して著しく効果の大きいことが見られた。

精製した魚肝油を貯臓した場合のビタミンＡの異性化は殆んど見られず、したがつて他の異性化要因と考え合せると、魚肝油中ビタミンＡの異性化は、死後肝臓中において、既に異性化の生ずる可能性があり、そのため新鮮な肝臓を冷凍処理するか、または直ちに可及的に、非加熱方法で肝油を採取することが、相対生物効力の高いビタミンＡを含有する魚肝油を、製造する方法としてよいことを明らかにした。

このことはまた新鮮な肝臓から非加熱的方法で抽出した魚肝油のビタミンＡのマレイン価が非常に低く、全トランス型が殆ど全ビタミンＡを占めると思われること、また分子蒸溜魚肝油においても、原肝油のビタミンＡの相対生物効力が大きい時は、分

子蒸溜魚肝油についても　比較的異性化の程度は小さく、原肝油ビタミンAの異性化の程度が大きい時は、得られた分子蒸溜魚肝油中のビタミンAのマレイン価も大きくなる。すなわち分子蒸溜魚肝油、非分子蒸溜魚肝油の区別が直ちに、相対生物効力の大小を意味しないことからも、充分いわれるのである。またここに見られる異性化は全トランス型からシス型への異性化であつて、これは生体中のビタミンAが始ど全トランス型であることと矛盾するように考えられるが、無水マレイン酸遅反応性異性体区分（SRI）添加の肝臓ホモジエネートによる実験では、この異性化の方向が逆になつていることが認められ、in vitroにおける魚肝油ビタミンAの異性化においても、ビタミンAシス異性体分布にある平衡点の存在が推察出来た（第21表）。すなわち肝臓ホモジエネートにSRIを加えたものはマレイン価が67.5であるのに、これを37℃、48時間のincubationによつて、31.7に低下した。

5. 合成ビタミンAの異性化について

魚肝油中に存在するビタミンAの数種のシス異性体のために、ビタミンAの理化学定量法の信頼性に問題が生じ、これがひいて、魚肝油ビタミンAの効力の信頼性に対して問題をおよぼしたのであるが、前述までに検討して来たように、ビタミンAのシス異性体の分布が魚肝油の本質的由来のものでなく、一種のarti factとすれば、これは何も魚肝油の問題でなく、ビタミンAそのものの問題として考えてよいわけである。またこのシス異性体の存在に関して、合成ビタミンAと魚肝油中ビタミンAの効力比較も問題となるが、合成ビタミンAは、必ずしも全トランス型ではなくまた全トランス型として合成されたビタミンAも、異性化する可能性がある。これはすでに製剤上の問題としても検討され、異性化に対する安定型として魚肝油型と称するシス異性体の配合割合が求められていることからも明らかである。しかし合成ビタミンAが魚肝油中のビタミンAと同様なパタンで異性化するかどうかは明らかでない。

そこでビタミンA合成品のアセテート、もしくはパルミテートを用いて、魚肝油ビタミンAと同様の方法で、異性化を検討した所、傾向的には魚肝油中のビタミンAの異性化とかわる所がないので、この点予期したとおりであつた。しかしながら150℃および240℃における異性化の速度は、むしろ合成ビタミンAにおいて著しいものが

あつた。ただ５０分後におけるマレイン価はほぼ等しく４９～５０を示すので、平衡点は同様の所にあるうと考えられる。異性化に影響する成分についても、血液およびＥＤＴＡの効果がやや著しく、魚肝油中ビタミンＡと違う所がなかつた。ビタミンＡの紫外線照射による損耗はすでに知られている所であるが、ビタミンＡの損失は照射５０分後において約６５％に対して、異性化はマレイン価32より２２となり、異性化が著しい。ビタミンＡパルミテートを肝臓ホモジエネートに添加した時のビタミンＡの異性化は、シロネズミ、マグロ肝臓とも３７℃４８時間において９％もしくは25％の異性化を生じ、シロネズミ肝臓においてやや著しいものが見られた。肝臓をincubationする前に１００℃、１５分処理を行なつたものと、そうでないものとの差は僅に３～６％であるから、この条件においては酵素的異性化は著しくない。加熱時の異性化が予期した程でないのは、魚肝油ビタミンＡの場合と同様であるが、肝臓中もしくは肝臓ホモジエネートを加えると、加熱時における異性化は２００℃附近において急激に著しくなる。これもビタミンＡが魚肝油中にある場合より、肝臓中にある場合の方が、異性化しやすいことを示唆している。これらはいずれも、特に合成ビタミンＡと、魚肝油中ビタミンＡが、in vitroにおいて特に異性化の様相において、異なつた点を示すものではない。

6. in vivoにおけるビタミンAの異性化について

in vitroにおいて魚肝油ビタミンＡおよび合成ビタミンＡの異性化について検討したが、シロネズミ肝臓においても、魚類の肝臓においても、その肝臓中のビタミンＡは殆ど、全トランス型であり、異性化にしたがつて全トランス、全トランス・neo－a、全トランス・neo－b、iso－a、iso－bというようにトランス→シス型の異性化が進行する。しかしながらneo－bのような立体障害のある異性体では、種々の条件でトランス型への異性化が知られているし、特殊な動物種以外では、体内では網膜組織を除いて、殆どが全トランス型である。

そこで種々の状態に異性化した魚肝油ビタミンＡ、または魚肝油のビタミンＡのslow reacting isomarの区分を採取して、飼料中もしくは、胃管投与を行なつて、肝臓中のビタミンＡのマレイン価を求めた。飼料中のビタミンＡ異性体とシロネズミ

肝臓のビタミンAの関係は第25表のように、飼料中のビタミンAはマレイン価が29で相当程度異性化していても、肝臓中に回収される場合には4となり、殆ど全トランス型と考えられる。また異性化の程度の著しい局方肝油より調製した無水マレイン酸遅反応性体区分（SRI）投与群と、局方肝油、パルミテート投与群を比較しても肝臓中のビタミンAのマレイン価は1.9ないし2.6で殆どが全トランスであることを示している（第26表）。胃管を用いて、シロネズミの胃に直接SRIを投与して、腸管におけるビタミンAを回収して測定した所、予期した程の異性化は見られなかつた。ただし回収率も14％と低く、このことからin vivoにはシス型からトランス型への異性化が生じ、しかもこれは主として肝臓内で生ずることがほぼ明らかである。ヒゲクジラ類の肝臓中のビタミンAは殆ど全トランス型であるが、ヒゲクジラが主として餌とする甲殻類のビタミンAがneo－bであることが知られている。しかしこの立体障害をともなうシス異性体は、本報における結果と異なり、腸壁中で容易に異性化されて、全トランス型となつて肝臓中に運ばれるので、この差異は立体障害にもとずくものと思われる。しかし生物効力はiso－aおよびiso－bとかわらないので、腸管における異性化の難易は、生物効力もしくは、肝中貯留の効率に関係はないといつてよいと考える。それにしても立体障害をともなわないシス異性体がin vitroにおいては全トランス→シス型の異性化を生じ、in vivoにおいてはシス型→全トランス型の異性化を生ずることは、ビタミンAの異性化の機構が生化学的に非常に興味があるところで、今後さらに吟味せらるべき問題である。しかもそれによつて生体内におけるビタミンAの役割についての新らしい解明の鍵の一つがあたえられるものと考える。

以上魚肝油中ビタミンAの異性化と、その生物効力について種々検討した結果は次のように要約される。

すなわち、

(1) 無水マレイン酸反応を用いてビタミンAのシス－トランス異性体分布を求め、相対生物効力を推定したところ、全トランス型に匹敵するものもあつたが、60％以下のものも認められた。

(2) 吸光分析、赤外分析の結果は、ビタミンAの異性化の著しい時にのみ、そのレスポンスを示すが、一般的に用いられる吸光分析値は、異性化のレベルが20％迄は生

第25表　シロネズミ肝臓中ビタミンAのマレイン価

飼料中ビタミンAのマレイン価	RP	肝中ビタミンA CP値※	マレイン価※	RP※
	%	I.U. %		
29	71	14,700	4	98
0	100	19,600	4	98

※　各7匹の平均値を示した。

第26表　シロネズミ肝中AとSRIの投与

試　　料	飼料中ビタミンAのマレイン価	肝中ビタミンAマレイン価
SRI投与群	100	2.9
局方肝油投与	29	1.9
ビタミンAパルミテート投与群	9.6	2.6

物効力と一致する。

③　クロマトグラフィーによると魚肝油ビタミンAの異性化にしたがつて、neo-aおよびiso-aの生成を確認し、かつiso-bの生成の推定を行なうことが出来た。

④　魚肝油ビタミンAの生物学的効果とマレイン価の関係は、

RP=101.6−MV×0.7647 のようであるが、ビタミンAの一般的投与量では魚肝油ビタミンAと全トランス型Aの間に差異は認められない。

⑤　魚肝油中ビタミンAの異性化は、加熱の処理においても、魚肝油が精製された場合におこりにくく、魚肝油中もしくは、肝臓ホモジエネート中で、非常に著しく、レシチンの存在は異性化を促進する。

⑥　合成ビタミンAについても魚肝油中ビタミンAとほぼ同様の異性化が認められた。

⑦　新鮮肝臓中もしくはその冷凍貯蔵物のビタミンAは殆ど全トランス型で、死後肝臓中における異性化が著しい。

⑧　生体肝臓中におけるビタミンAは、飼料中または投与されたビタミンA源中の異性体含量に関係なく、殆ど全トランス型である。

これら魚肝油ビタミンAの異性化と生物効力について、種々明らかにした　とから、

魚肝油中のビタミンAの生物効力は、試料によつてシス異性体の存在によつて全トランス型に比して効力が劣るが、これが種々の要因、特に肝油採取前の肝臓処理のいかんによつて、異性化し生じたもので、本来魚肝臓中のビタミンAは、殆ど全トランス型であり、肝臓を新鮮な状態で採油すれば、殆ど全トランス型ビタミンAと同様の効力を示す肝油の、製造の可能性を示したと考える。

吸光分析法の魚肝油ビタミンA効力に対する信頼性については、マレイン価の低い試料については問題なく、また合成ビタミンAとのこの点に関する比較は、合成ビタミンAにおいても種々の条件での異性化がみられ、この予防策を講ずることなしには、必ずしも全トランス型と限らないので、全く意味のないことも明らかにし得た。

また生物試験の結果も、その方法や試験に用いる動物種によつては、特異なレスポンスの結果を示すにすぎない場合もあるので、生物試験で得た値が、理化学的量法の結果と異なつたとしても、必ずしも生物試験値が真値を示すとは限らず、マレイン価その他によつてさらに吟味の必要を示すものである。またこれらの知識はひとり魚肝油源ビタミンAの利用上、特に飼料強化等に利用することの多い本邦で、役立つ所が甚だ大きいのみならず、合成ビタミンAを利用する場合にもまた非常に参考となるもので、その意義は少なからざるものがあると信ずる。

審査結果の要旨

本論文は、魚肝油に含まれるビタミンAシス異性体の来源とその生物効力に関する研究を内容とするものである。

先づ多数の魚肝油試料について、ビタミンA（V・A）を二つの常用される理化学的定量法によつて求め、それらが互に殆ど一致しないこと、それらの相対生物効力が異ること、更に全トランス V・A とマレイン酸との反応を利して著者が考案したV・A異性体定量法によつて得たV・A異性体量の異ること、更に又それらとニワトリ雛及び白ネズミの成長試験との関連の検討などから、魚肝油の V・A 異性体は本来的のものでなく、肝油製造中の何等かの原因などによつて産生される一種の人工産物であろうと考えた。

それ故著者は魚肝油V・Aの加熱による異性化を研究し240℃、30分で全V・Aの50%が異性化することを証明した。次で肝臓組織の添加がよく異性化を促すが、酵素的異性化は少ないことを見た。或いは血液の添加も異性化を促すが、レシチン及び肝細胞顆粒区分が又著しく促進することを見出した。しかしアルブミン、カゼイン、グルコースなどは殆ど影響がなく、肝臓の凍結貯蔵或いは精製した肝油の室温貯蔵が殆ど異性化を起さないことを見た。なお次に以上を改めて合成V・A酢酸エステル及びパルミチン酸エステルについて検討し、魚肝油の時と殆で同様であることを証明した。又異性化油からアルミナ吸着法によつてNeo－a，Iso－a及びIso－bの三シス異性体を分離証明すると共に、それら異性体が餌料又は胃管投与によつて白ネズミ肝臓へ貯えられると殆どすべて全トランス型になることを明かにした。

以上の如く著者は魚肝油中のV・A異性体の来源を種々証明して、それが一種の人工産物であることを明かにすると共に、新鮮肝臓の非加熱処理による採油、それの夾雑物除去及び肝臓の凍結貯蔵などによつてV・A異性化防除の方法を新しく提案したことは水産学の基礎的新知見を加えるのみでなく、実用への寄与も大きいと考えられ、審査員一同は本論文に対して農学博士の学位を授与するに値すると認定した。