

氏 名 (本籍)                    <sup>まさ</sup>正            <sup>き</sup>木            <sup>きよ</sup>恭            <sup>すけ</sup>介

学 位 の 種 類                    農            学            博            士

学 位 記 番 号                    農 博 第        338        号

学位授与年月日                    昭和 60 年 3 月 26 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 A の体内動態に関する研究  
—とくに肝臓を中心として—

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教授 木村修一

教授 金田尚志

教授 堀口雅昭

# 論文内容要旨

## 序

脂溶性ビタミンの代謝ならびに生理作用に関しては、近年目覚ましい進展が見られる。ビタミンA（以下VAと略す）の分野においても、視覚サイクルにおける役割および生殖機能の維持だけでなく、糖蛋白生成系における lipid intermediate の構成因子としてもVAが重要であることが明らかになってきた。また、細胞の分化における役割を介して、ガンに対するVA誘導体の薬理学的効果などが分子レベルで解明されつつある。一方、VAの体内動態に関する研究も著しく進歩しており、なかでもVA結合蛋白(retinol binding protein; 以下RBPと略す)の発見と血中の転送形式の解明などは注目すべきものといえる。

食餌中のVAは、腸管吸収を受けた後 retinyl palmitateに転換され、カイロミクロンによって肝臓へと転送される(Fig.1)。肝臓はRBPを合成し、この retinol結合体を分泌するが、VAの標的器官への供給は、この合成、分泌の過程で調節されていると考えられる。また、余剰のVAはVA貯蔵細胞である伊東細胞に貯蔵される。血中では、甲状腺ホルモンの結合蛋白の一つとして知られる Thyroxine binding prealbumin（以下PAと略す）とRBPが、1:1のモル比でRBP-PA複合体として存在する。しかし、RBPが独立して肝臓で合成、分泌されたPAと血管内で結合するかどうかは、必ずしも明らかではない。網膜や生殖器官などの標的臓器においては、RBPそのものに対する細胞膜レセプターが存在し、これを通してVAだけが細胞内に摂取される。役目の終わったRBPは、腎臓において異化される。細胞内に摂取されたVAの転送には、細胞内RBP（以下CRBPと略す）が関与していると考えられる。

このように、VA代謝においてRBPの果たす重要な役割が示されたが、RBP-PA複合体の生理的意味に関しては必ずしも明らかでなく、また、ホルモン（Thyroxine: 以下T<sub>4</sub>と略す）とビタミンが共通の複合体により血中を転送されるということは興味深い事実と考えられる。大庭らは、甲状腺機能とRBP-PA複合体の関連性について検討を行い、VA欠乏時における甲状腺機能の低下、血中T<sub>4</sub>レベルの低下、PAと結合したT<sub>4</sub>の減少、および Thyroxine binding globulin（以下TBGと略す）と結合したT<sub>4</sub>の増加を認めた。本研究では、まずこの関係を一層明らかにすることを目的として甲状腺機能を変化させた時の血中蛋白の変化を検討した。すなわちラットを用い、食餌中のVAレベルを変えた時ならびにヨード欠乏時の成長および血中VA濃度を検討し、明らかに甲状腺機能とVA代謝が相互に大きくかわりあっていることを確認した（第1章）。

先に述べたように肝臓はVAの貯蔵の場であり、末梢へのVAの供給をRBPを介して調節していると考えられているが、この働きを正常に保つためには甲状腺機能の役割が重要と思われる。そこで、VAの生体内動態を特に肝臓を中心に追跡し、VA欠乏時のVAの生体内分布および甲状腺機能低下条件下におけるVAの動態をin vivo で検討した（第

2章)。さらに、肝臓からのVA分泌の実態について、還流法を用いて *in situ* 実験系で検討した(第3章)。以下、その概要を述べる。

## 第 1 章

### —— 生体内VAレベルと甲状腺機能との関連についての実験学的確認 ——

#### 第1節 甲状腺機能と血中蛋白の変動

VA欠乏条件下ではPAと結合した $T_4$ が減少し、逆にグロブリンと結合した $T_4$ が増加することが認められている。この関係を確認する目的で、実験動物を $T_4$ 投与群、PTU(抗甲状腺剤)投与群の2群に分け、甲状腺機能を実験的に変動させた時の血中蛋白の変化をSephadex G-100のゲルろ過パターンより観察した。その結果、甲状腺機能が低下するとグロブリンの割合が増加することを認めた。大庭らの知見と考えあわせると、VA欠乏におけるPAの $T_4$ 結合能の変化は、甲状腺機能の低下によりグロブリンの割合が増加したことに起因すると考えられる。

#### 第2節 甲状腺機能とVA代謝との関連性

第1節の結果をさらに追究する目的でラットを用い、VA欠乏食、VA欠乏食+低ヨード食という条件下で飼育し、成長、血中 $T_4$ 、および血中VAを正常食の群と比較検討した。その結果、VA欠乏+低ヨード食群はVA欠乏食群に比べて成長も悪く、血中VA濃度も28日目で低下することが確認された。また甲状腺機能低下の条件がVAの代謝を異常にすることが示唆された。

発展途上の国々には、VA不足による盲目とヨード不足による地方病性甲状腺腫が社会問題となっており、しかもこの両者はしばしば併発している。本実験の結果は、両症状は互いに、他をより悪化させている可能性を示唆している。

## ま と め

甲状腺機能が低下するとグロブリンの割合が増加することを認めた。VA欠乏動物におけるPAと結合した $T_4$ の減少とTBGと結合した $T_4$ の増加は、甲状腺機能の低下により血中TBGの割合が増加したことに起因すると考えられる。また、甲状腺機能低下の条件がVAの代謝を異常にすることが示唆され、甲状腺機能がVA代謝にかかわっていること

を確認した。

## 第 2 章

### — In vivo におけるVAの動態に関する実験学的検討 —

#### 第1節 VA欠乏状態におけるVAの動態

VA欠乏におけるRBPの代謝についてはすでに武藤らの報告がある。すなわち、VA欠乏では血中RBPが低下しているが、VAの再投与によって5時間以内にそのレベルが急速に上昇し、29時間以降は正常値を維持することが認められた。RBPの合成部位は肝臓であるが、このような、速やかな応答はむしろ肝臓におけるRBPの合成より分泌過程によるものと考えられる。このようにVA代謝においてRBPの果す役割は重要である。そこで本研究では、このようなVAの動態を把握するためRBPの免疫定量法を確立し、これを用いてラットRBPの動態を検討した。

##### (1) RBPの単離精製およびその抗血清の調製についての検討

ラットRBPはヒトRBPと物理化学的性質がよく似ているが免疫交叉性はない。そこでラットを用いて動物実験する場合、ラット自身のRBPを精製することが必要となる。これまでの報告でラットRBPの精製は、他の動物と比較してRBP-PA複合体とアルブミンの分離が非常に困難とされている。そこで、この点の改良を試みた。すなわち、本研究ではアルブミンを特異的に吸着する Blue Sepharose CL-6B に着目して精製することにした。その結果、プラズマ647mlから DEAE cellulose → Sephadex G-75 → Blue Sepharose CL-6B → Sephadex G-100 を経て、10mgのラットRBPを単離精製することに成功した(Table 1)。紫外吸収スペクトル、蛍光スペクトル、電気泳動および免疫学的検討より単一のラットRBPであることが確認された。Blue Sepharose CL-6Bを用いることによりRBP-PA複合体が解離し、アルブミンを大部分除去できることが確認された。これまで困難とされていたラットRBPの精製を容易とした。引き続き精製ラットRBPを用いて抗血清を作製し検討した結果、本抗血清はラットRBPの定量に十分使用しうることを認めた。

##### (2) VA欠乏ラットの血中VAおよびRBPの動態

VAの生体内動態を追跡する目的で、VA欠乏動物を作出し、これにVAを一定量投与して回復させ、その後の血中のVA, RBPのレベルを検討した。加えて、 $T_4$ のレベルの経時的变化も検討することが目標である。本研究の目的から、実験開始時のラット肝臓中のVAレベルをそろえることは必須条件であった。そこで、3週間VA欠乏食で飼育し

肝臓中のVAを枯渇させた後、すべてのラットに一定量の retinyl palmitate を1回投与し、翌日から再びVA欠乏食で飼育し、血中VA、RBPおよび甲状腺ホルモンレベルを測定した。その結果、欠乏動物に対してVAを投与すると、血中VAおよびRBPレベルは投与1日目で速やかに正常値までに達しているのに対し、血中T<sub>4</sub>レベルは数日かかって徐々に回復していくことが観察された (Fig.2)。投与したVAは一度肝臓に取り込まれRBPとともに血中に分泌されることがわかっているが、上に述べたとおりVAの血中への出現とその response が速やかであることが判明した。これに対してT<sub>4</sub> レベルは緩慢な response を示すことが明らかになった。VA投与に対するVAレベルの response は、short term の反応であり、甲状腺機能に対する影響は long term の反応であることがわかる。なお、再び欠乏に戻すと、この三者は明らかに低下が見られることから、肝臓からのVA分泌にはそれぞれ異なるプロセスでVA、RBP、T<sub>4</sub> が関係していることが示唆された。

### (3) VA欠乏動物の肝臓中VAの存在形態

余剰のVAは retinyl palmitate として肝臓中の伊東細胞に貯蔵され、絶えず肝実質細胞の retinol プールと動的平衡状態にあると考えられている。そこでVA欠乏動物の肝臓中および血中のVAレベルを検討した。その結果、欠乏動物の肝臓においては、わずかながらretinolが存在していることを認めたが、貯蔵形態であるretinyl palmitateは認められなかった。このことにより、血中VA、RBPレベルが減少したと考えられる。

## 第2節 甲状腺機能低下条件下におけるVAの臓器内分布および肝臓への取り込みと分泌

第1章で述べたように甲状腺機能は、VAの肝臓への取り込み、分泌または標的器官へのVAの受け渡しに関与していることが推測される。そこで低ヨード食でラットを飼育し甲状腺機能低下状態としてVAの動態を検討した。

### (1) 甲状腺機能低下条件下におけるVAの臓器分布と標的臓器(とくに精巣)の機能的形態的变化

離乳直後の Wistar 系雄ラットをヨード欠乏およびヨード欠乏にさらに抗甲状腺剤(propyl thiouracil; PTU)を投与する条件下で飼育し、それらの動物の血中T<sub>4</sub> レベルの変動とVAの動態ならびに精巣組織の変化について検討した。(VAの標的臓器として精巣を選んだ理由は、眼と並んでその発育と機能発現にVA依存性が高く、VA欠乏症では精細管数の減少、精上皮の変性、精子形成の停止、副生殖腺の萎縮および性ホルモン産生低下を起こすことが知られているからである。)その結果、ヨード欠乏およびヨード欠乏+PTU群は対照に比べて血中VAおよびRBPレベルには差が見られなかった。しかし、VAの標的臓器である精巣中のVAレベルはT<sub>4</sub> レベルが低下するに従って上昇し

RBPを異化する臓器である腎臓では逆に低下した。一方、精巣、精嚢腺および腎臓重量は、ヨード欠乏群、ヨード欠乏+PTU群で減少し、精巣の組織所見では、間質が萎縮し精細管の直径が小さくなり精子形成能も低下することが認められた (Fig.3)。以上のことから甲状腺機能低下状態の動物では、VAの標的細胞内の利用低下をきたしていることが示唆された。そのことが標的器官のVAレベルを高くしているものと考えられる。血中 $T_4$ レベルと標的臓器のVAレベルとの間には逆相関があり、腎臓の場合は正の相関がみられた (Fig.4)。

なお、血中の甲状腺ホルモンの中では $T_3$ には群間に差は認められなかったが、 $T_4$ には大きな差が認められた。

## (2) 甲状腺機能低下条件下における $^3H$ -retinolの肝臓への取り込みと血中代謝速度

(1)で、低 $T_4$ 状態では組織におけるVAの利用速度の低下が示唆されたが、利用されるVA量を正確に把握するためには、アイソトープの使用が適切と考えられる。そこで甲状腺機能低下条件下における肝臓へのVAの取り込み、および標的器官へのVAの分泌を検討する目的で、低ヨード食で飼育した動物に $^3H$ -retinolを経口投与し24時間後のradioactivityを計測した。その結果、肝臓中の $^3H$ -retinol量は低ヨード食群で有意に低く、血中、腎臓、精巣も低値を示した (Table 2)。このことからVAの肝臓への取り込みの低下が考えられた。しかしながら、経口投与では小腸を経由するため、甲状腺機能低下による腸管吸収の低下が関与している可能性も考えられるので、同様の実験を血管内投与で行った。しかし、経口投与と同様の結果が得られた。次に、投与後の $^3H$ -retinolの経時的変化を検討した (Fig.5)。他の臓器と比較して肝臓への分布が圧倒的に高いという事実とVAの代謝、吸収の経路から考えて、投与した $^3H$ -retinolは一旦肝臓に取り込まれたのちRBPとともに分泌されるが、そのRBPの分泌量は低ヨード食群で有意に低いことが推定された。このことは、先の肝臓以外の臓器中のVAレベルが変動したと深く関連していると思われる。

## (3) 甲状腺機能低下条件下におけるRBPの代謝

肝臓から分泌されたRBPの代謝速度が低ヨード食群でどのように変化しているかを検討した。精製ラットRBPをlactoperoxydase法により $^{125}I$ でラベルして $^{125}I$ -RBPを作製した。 $^3H$ -retinol投与実験と同様の方法で動物に投与して経時的に採血し、RBPの代謝速度を検討した。その結果、血中、腎臓、精巣とも低ヨード食群では有意に高値を示し、代謝速度が遅いことが示唆された (Table 3)。血中 $^{125}I$ -RBPの経時的変化では、対照群と比べて常に高値を示した (Fig.6)。すなわち、臓器への取り込みの活性が低く、腎臓での代謝も低いことが推測された。一方、RBPの代謝は甲状腺機能が低下すると対照群に比べて遅くなり、それが標的器官で高値を示す結果になると考えられる。このことは(1)における精巣、腎臓におけるVAレベルを裏づけるものと思われる。

## まとめ

VA動態を正確に把握する意味で、その結合蛋白であるRBPの免疫定量を目的として、ラットRBPをBlue Sepharose CL-6Bを用いて単離精製し、従来困難とされていたラットRBPの精製を容易とした。

VA欠乏動物のVA動態の観察によりVA投与回復に対する血中VAレベルのresponseはshort termの反応であり、一方T<sub>4</sub>レベルに対する影響はlong termの反応であることがわかった。また、再び欠乏に戻すと、VA、RBP、T<sub>4</sub>とも明らかに低下することから肝臓からのVA分泌には、この三者がそれぞれ異なるプロセスで、関係していることが示唆された。

甲状腺機能低下状態の動物では、VAの肝臓への取り込み量が低下し、肝臓からのRBPに結合したVAの分泌も低下することが示唆された。一方、RBPの腎臓における代謝速度も低下することが明らかとなった。VAの代謝の特徴として伊東細胞などの特異的貯蔵組織のあることがあげられるが、この貯蔵組織への取り込み、および肝臓からのRBP-VA複合体の分泌に甲状腺機能が関与していることが考えられる。

## 第 3 章

### — In situ におけるVAの動態に関する実験学的検討 —

第2章の実験ではVAの肝臓への取り込みおよび分泌の機序を解明するためにVA欠乏動物、甲状腺機能低下動物を作出した。生体を供試する場合は、関与する要因が多く代謝された物質が更に代謝されることもあって、条件が複雑になる。VAの取り込み、貯蔵、RBPやPAなどの結合蛋白の合成、分泌などVA代謝の重要な部分は肝臓で行われており、肝臓におけるVA代謝を調べる場合は肝還流法が最も適当な系であると考えられる。これは肝臓を生体とほぼ同じ条件下に保って還流液を還流する方法で、肝臓は少なくとも2～3時間は活動状態にあるので、生体におけるVA代謝の究明ができる。

肝臓還流装置は大別して摘出肝臓の還流を行うMiller型装置と、in situ 還流を目的とするMortimore型(Fig.7)があるが、本研究では肝臓細胞に与える損傷が極めてわずかで還流肝の調製が容易であるMortimore型装置を自作した。還流液には種々のホルモン(特にT<sub>4</sub>)やビタミン(VA)などの混入を防ぐために本研究では血液は用いず人工血液として開発中のFC-43 Emulsionを使用した。

## 第1節 VA欠乏状態におけるVAの肝臓への取り込みと分泌

in vivo の動物実験においてVA (retinyl palmitate) を投与すると血中RBP, VAレベルが速やかに上昇したが、機構の詳細については不明な点が多く残されている。そこで第1章と同様の方法でVA欠乏動物を作出し、その肝臓を実験に供した。また還流液中のVAは微量であり、さらに retinol と retinyl palmitate の分別定量が必要であったので、VAの定量には、HPLCを用いることにした。カラムは Nucleocil C18 を使用した。

還流液50ml中にretinyl palmitate を投与して50IU/dl の濃度にしておき、VA欠乏動物の肝臓と正常動物の肝臓とを比較した。

retinyl palmitateの取り込みに関しては、VA欠乏肝、正常肝とも速やかに(20分以内)取り込まれることが明らかとなった(Fig.8)。

肝臓からのretinol分泌に関しては、retinyl palmitate を還流開始時に還流液に添加しなかった正常肝においては、ほとんどretinolが分泌されなかったのに対しretinyl palmitate を添加した正常肝、VA欠乏肝においては、retinolが速やかに分泌されることが明らかとなった(Fig.9)。また、この正常肝とVA欠乏肝との分泌速度の違いは、肝貯蔵VAレベルの違いに起因すると考えられる(Table 4)。

retinyl palmitate を添加した正常肝の80-120分のretinolレベルは約120IU/dlであり、それ以上は分泌されなかった。この値は正常ラットの血中VAレベルに相当し、また添加したretinyl palmitate 量よりも多くretinolが分泌されたことから、retinyl palmitateは肝臓に対して何らかの機作でシグナルを与え、RBPに結合したretinolを分泌させ、ラット血中の正常値と同レベルまで引き上げることが考えられる。生体内では、血中VAレベルは一定であり恒常性を保っているが、血中VAがシグナルとなって肝臓がVA分泌量を調節していることが考えられ、血中VAレベルが一定になるよう制御されていることが示唆された。

また、還流液中のVAの形態を確認するため、Sephadex G-100 を用いて還流液のゲルろ過を行った(Fig.10)。分子量および免疫学的検討から、還流液中のVAはRBP-VAの形をとっており、還流液中にPAの存在量が少ないため、RBP-VA-PAという形をとらないことが明らかとなった。肝臓からのVAの分泌機構としては、RBPは独立して肝臓で合成、分泌されたPAと血管内で結合するという仮説が出されているが、本実験の結果はこれをin situ 系で実証したことになる。正常、VA欠乏のいずれの還流液においても大部分がRBP-VAであるという結果が得られた。

## 第2節 肝臓のVA分泌に及ぼす甲状腺ホルモンの影響およびその他の因子 甲状腺機能低下状態の動物では、肝臓へのVAの取り込みと分泌が低下することを第2



章で明らかにした。その原因として末梢における利用の低下により二次的に肝臓へのVAへの取り込み、分泌が低下したと考えたが、 $T_4$ が肝臓へ特異的に作用しVAの肝臓内での代謝を調節している可能性も考えられる。そこで肝臓のVA分泌に及ぼす甲状腺ホルモンの影響について肝臓還流法を用いて検討した。また本章第1節よりretinyl palmitateは肝臓からのretinolの分泌を刺激し促進することが明らかとなったが、retinyl palmitate以外のVA分泌促進因子に関しても併せて検討した。

#### (1) 肝臓のVA分泌におよぼす甲状腺ホルモンの影響

正常動物およびVA欠乏動物の肝臓を用いて還流実験を行った。 $T_4$ を生体の値に相当するように調整した還流液を与えた群と、 $T_4$ 無添加の還流液を与えた群に分け、第1節と同様の方法で肝臓のVA代謝における甲状腺機能の関与について検討した。

retinyl palmitateの肝臓への取り込みおよびretinolの分泌に関して、正常肝、VA欠乏肝とも $T_4$ の影響は見られなかった(Fig.11, Fig.12)。この結果から、甲状腺ホルモンはVAの肝臓への取り込みおよび分泌に対して直接的には関与していないことが明らかとなった。in vivoで観察された甲状腺機能低下条件におけるVAの取り込みおよび分泌の低下は、甲状腺機能低下によって末梢のVA利用が緩慢となり、このことによってフィードバックコントロールを受けた結果、すなわち二次的な作用により発現したものと考えられる。

#### (2) 肝臓のVA分泌に関与するその他の因子

アルコールの長期投与によって慢性アルコール中毒を起こしたラットでは、肝臓中のVAが正常動物と比べ半減することが知られている。そこでエタノールが肝臓からのVA分泌に対して影響があるのではないかと考え、還流60分後にエタノールを還流液中4%となるように投与した。その結果、エタノールには肝臓中からVA分泌を促進する作用のあることが明らかとなった(Fig.13)。この結果は、in vivoでの現象を説明するのに重要な知見であると考えられる。

以上の結果から、還流液中にretinyl palmitate (VA) またはエタノールが含まれない場合は、たとえ肝臓中の貯蔵VAが正常レベルでも、その分泌は抑制されることが示された。したがってVAおよびエタノールは肝臓のVA分泌を促す因子として働き、これによって還流液中のVA (RBP-VA) のレベルを生体のレベルにまで引き上げることが示唆された。

### まとめ

肝臓はVA代謝の重要な場である。そこで、肝臓におけるVA代謝を検討するために肝臓還流法を用いた。まず、VA欠乏肝および正常肝におけるretinyl palmitateの肝臓への

取り込みについて検討した結果、両群とも速やかに取り込まれることが明らかとなった。肝臓からのretinolの分泌に関しては、retinyl palmitate を添加しなかった正常肝ではほとんどretinolが分泌されなかったのに対し、retinyl palmitateを添加した正常肝、VA欠乏肝では、retinol が速やかに分泌された。

また遷流液中のretinolの形態がRBP-VAであったことから、RBPは独立して肝臓で合成、分泌されたPAと血管内で速やかに結合するということが明らかとなった。

つぎに、肝臓のVA分泌に及ぼす甲状腺ホルモンの影響について検討したが、甲状腺ホルモンは直接的には、関与していないことが明らかとなった。その他の因子としてエタノールに着目し検討したところ、分泌を促進する能力のあることが明らかとなった。

VAやエタノールが遷流液中に存在しなければ正常肝ではVA分泌が抑制されている状態にあり、これらの因子は、肝臓のVA分泌の蓋を何らかの機作であける働きをしていると考えられる。以上の結果は、VA欠乏動物の回復実験においてVA、RBPの血中レベルが速やかなresponseを示すことを説明する材料となる。

## 要 約

Wistar系雄ラットを用い、VAの体内動態を検討した結果、以下の知見が得られた。

- ① VA欠乏におけるPAと $T_4$ とが結合した複合体の減少は、甲状腺機能の低下により血中TBGの割合が増加したことに起因すると考えられ、また甲状腺機能の条件がVAの代謝を異常にすることが実験的に示され、甲状腺機能がVAの代謝に大きくかかわっていることが確認された。
- ② VAの動態を正確に把握するために、RBPの免疫定量を目的としてRBPの単離精製およびその抗血清の調製について検討した結果、Blue Sepharose CL-6Bを使用することにより従来困難とされていたラットRBPの精製を容易とした。
- ③ VA欠乏動物におけるVA投与回復に対する血中VAレベルのresponseはshort termの反応であり、血中 $T_4$ レベルに対する影響はlong termの反応であることがわかった。なお、再び欠乏に戻すと血中VA、RBP、 $T_4$ の三者は明らかに低下が見られることから、肝臓からのVA分泌にはそれぞれ異なるプロセスでVA、RBPおよび $T_4$ が関係していることが示唆された。
- ④ ①より甲状腺機能はVAの肝臓への取り込み、分泌、または標的器官へのVAの受け

渡しに参与していることが推測されたため、動物を甲状腺機能低下状態にしてVAの動態を検討した。その結果、標的器官におけるVA利用の低下が明らかとなった。また肝臓ではVAの取り込みが低下し、RBP-VAの分泌も低下すると考えられた。

- ⑤ 肝臓におけるVAの代謝を調べる場合、肝還流法が最も適当であると考えMortimore型還流装置を自作し、in situでの肝臓のVAの取り込み、分泌調節について検討した。その結果、retinyl palmitateの還流液への添加により還流液中のretinol量を正常ラットの血中レベルまで引き上げることが示された。これによって血中VAレベルが肝臓からのVAの分泌を制御し、血中VAレベルの恒常性を保つ因子として働いていることが示唆された。
- ⑥ 還流液中に分泌されるretinolの形態がRBP-VAであったことから、RBPは肝臓からRBP-VAのかたちで放出されたのち、PAと血管内で複合体をつくることが実証された。
- ⑦ 還流実験により、甲状腺ホルモンは直接的に肝臓のVA代謝に参与しているのではなく、末梢組織におけるVA代謝の低下による二次的なものであることが推測される。
- ⑧ VAは肝臓のVAの分泌を何らかの機作で促進していることがわかった。なお、エタノールにもそのような作用のあることを見出した。

上記の内容をFig.14にまとめて示した。

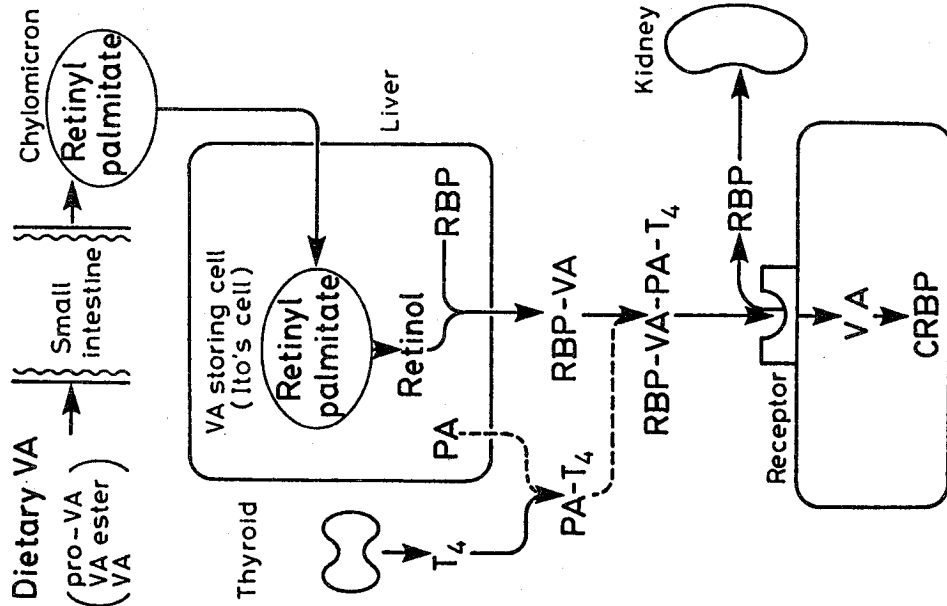


Fig. 1. VA METABOLISM

Table 1. Purification of rat retinol-binding protein

Sample	Total protein	Original protein
Rat plasma (647ml)	45677 mg <sup>a)</sup>	100 %
Dialysis	36655 mg <sup>b)</sup>	80.6 %
DEAE-cellulose	3740 mg <sup>b)</sup>	8.2 %
Sephadex G-75	217 mg <sup>b)</sup>	0.48 %
Blue sepharose CL-6B	21 mg <sup>b)</sup>	0.05 %
Sephadex G-100	10 mg <sup>b), c)</sup>	0.02 %

a) Determined by the Lowry method.

b) Determined by A280:A260 ratio.

c) In this step 10.0mg of highly purified retinol-binding protein and high yield (34.5%) were obtained.

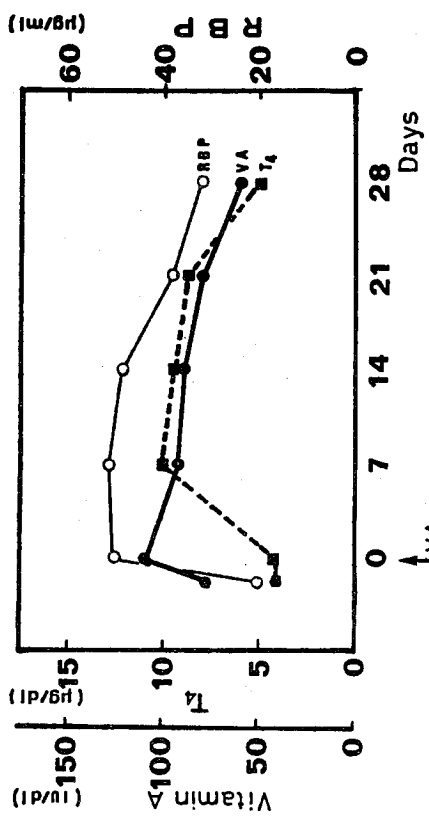


Fig. 2. Time course changes of plasma RBP, VA and T<sub>4</sub> levels.

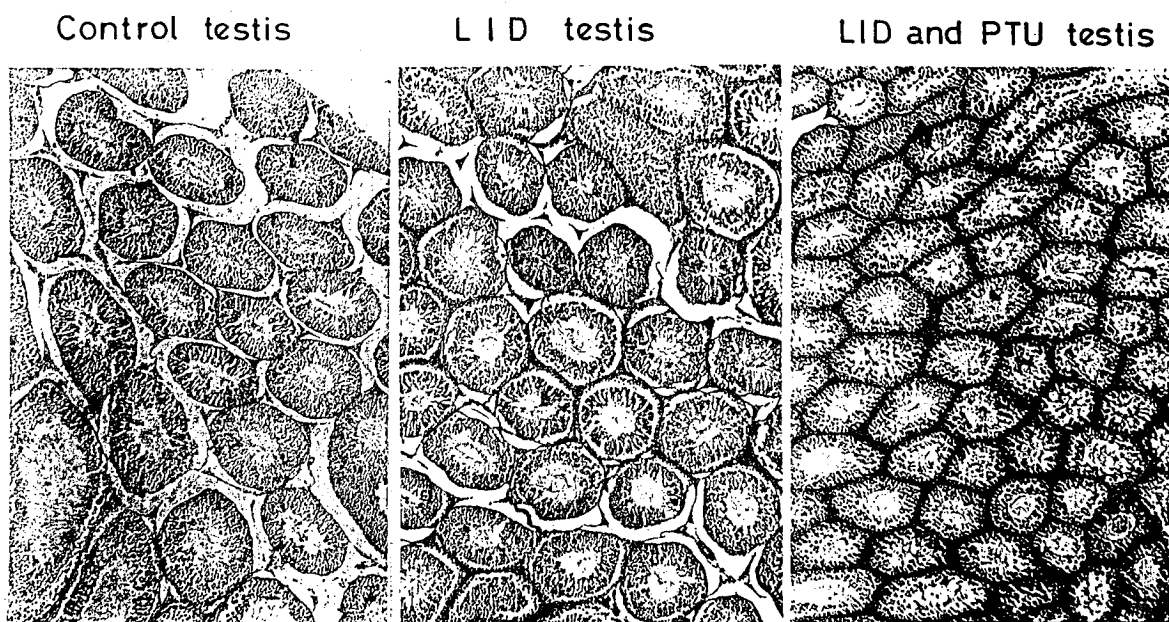


Fig. 3. Cross section of testis. Hematoxylin - eosine X 60.

Table 2. Effects of low iodine on  $^3\text{H}$ -vitamin A levels in plasma, kidney, testis and liver at 24 hours after administration directly into the stomach

	Control	L I D
Plasma cpm/ml $\times 10^{-3}$	27.61 $\pm$ 4.16	22.90 $\pm$ 4.05*
Kidney cpm/g $\times 10^{-3}$	136.33 $\pm$ 55.41	102.33 $\pm$ 27.11
Testis cpm/g $\times 10^{-3}$	37.61 $\pm$ 6.55	35.31 $\pm$ 6.72
Liver cpm/g $\times 10^{-3}$	784.53 $\pm$ 195.12	583.27 $\pm$ 195.97*

All values listed are mean  $\pm$  S.E.M. for 10 rats.

\* $p < 0.05$  compared with control.

Table 3. Effects of low iodine on  $^{125}\text{I}$  labeled RBP levels in plasma, kidney and testis at 29 hours after administration

Groups	Plasma cpm/ml $\times 10^{-3}$	Kidney cpm/g $\times 10^{-3}$	Testis cpm/g $\times 10^{-3}$
Control	98.6 $\pm$ 13.7	22.9 $\pm$ 4.0	10.5 $\pm$ 1.9
L I D	226.0 $\pm$ 20.1*	92.6 $\pm$ 11.7*	19.5 $\pm$ 2.8*

All values listed are mean  $\pm$  S.E.M. for 5 rats.

\*  $p < 0.001$  compared with control.

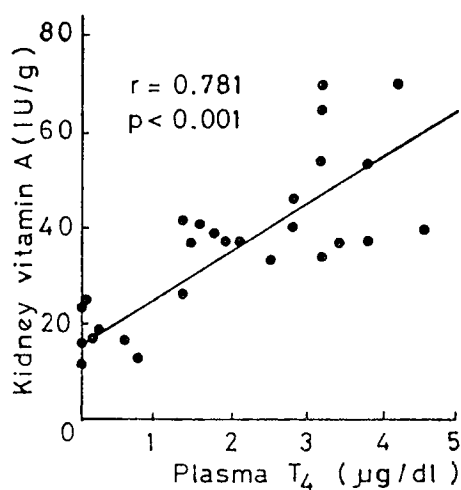
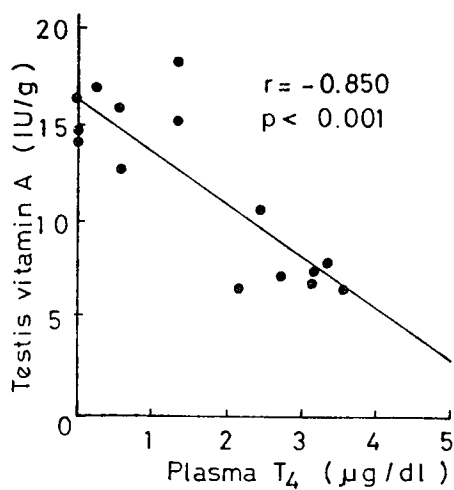


Fig.4. Correlation of plasma  $T_4$  with testis VA and kidney VA.

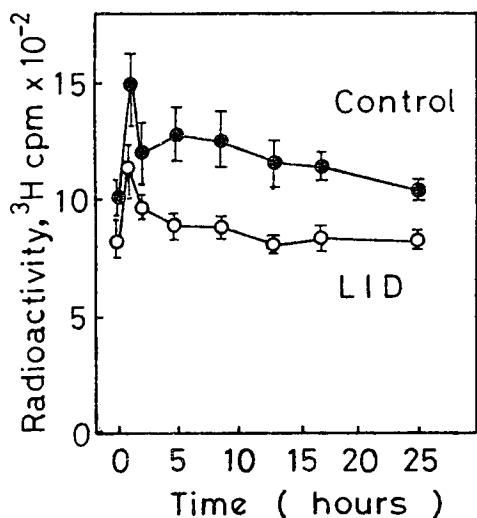


Fig. 5. Distribution of  $^3\text{H}$ -retinol in plasma of control and LID rats at different times after intravenous administration.

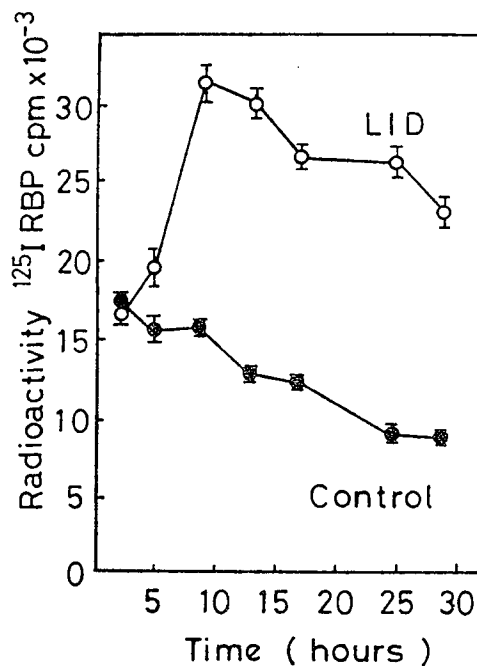


Fig. 6. Distribution of  $^{125}\text{I}$ RBP in plasma of control and LID rat at different times after administration.

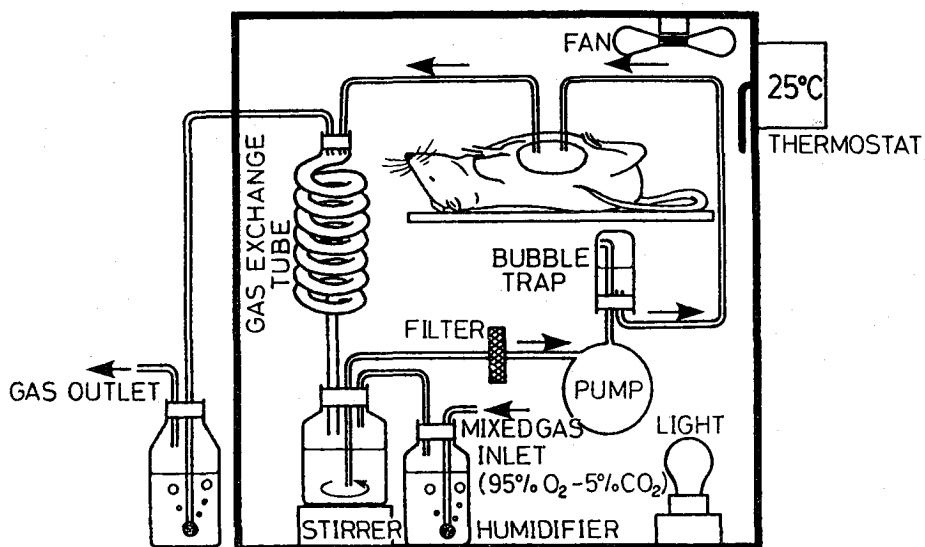


Fig. 7. Perfusion apparatus.

Table 4. The effects of vitamin A deficiency on plasma vitamin A, RBP and liver vitamin A and perfused liver vitamin A

	Normal	VA deficient
Plasma retinol IU/dl	105.8 ± 22.5	8.75 ± 2.08
Plasma RBP $\mu$ g/dl	58.9 ± 6.3	8.2 ± 3.5
Liver retinol IU/g	12.89 ± 3.47	0.67 ± 0.21
retinyl palmitate	244.6 ± 58.9	N. D.
.....		
+ Retinyl palmitate perfused liver		
retinol IU/g	28.8 ± 2.91	10.0 ± 0.91
retinyl palmitate	315.5 ± 10.8	4.7 ± 4.13

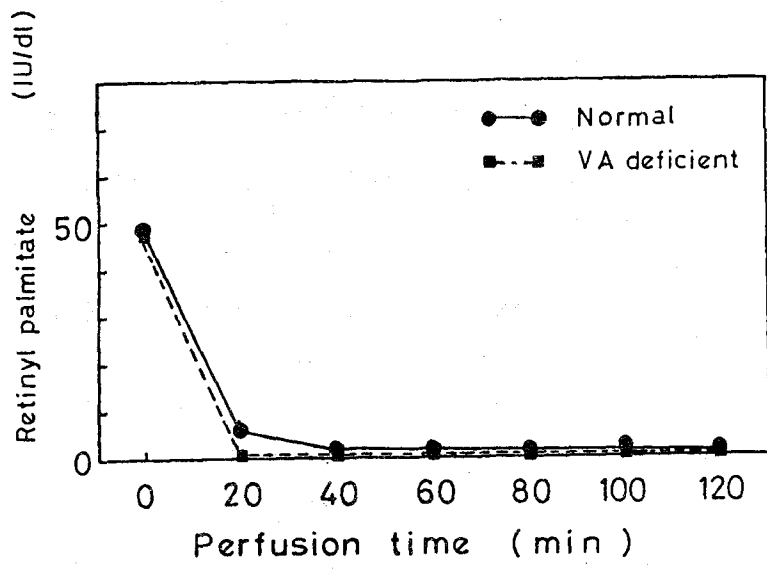


Fig. 8. Effect of VA status on retinyl palmitate uptake from the perfusate.

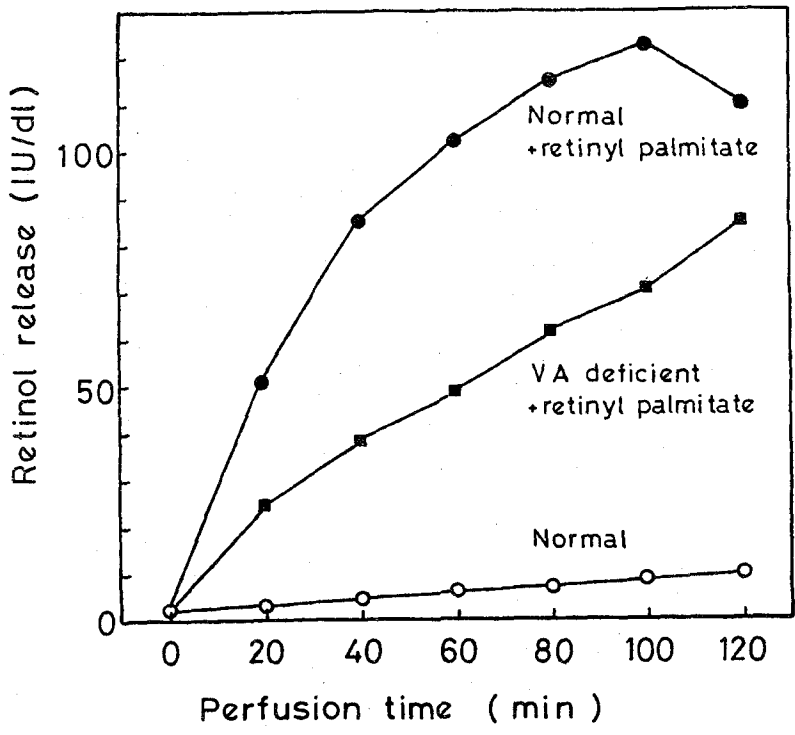


Fig. 9. Effect of retinyl palmitate on retinol release from livers perfused.



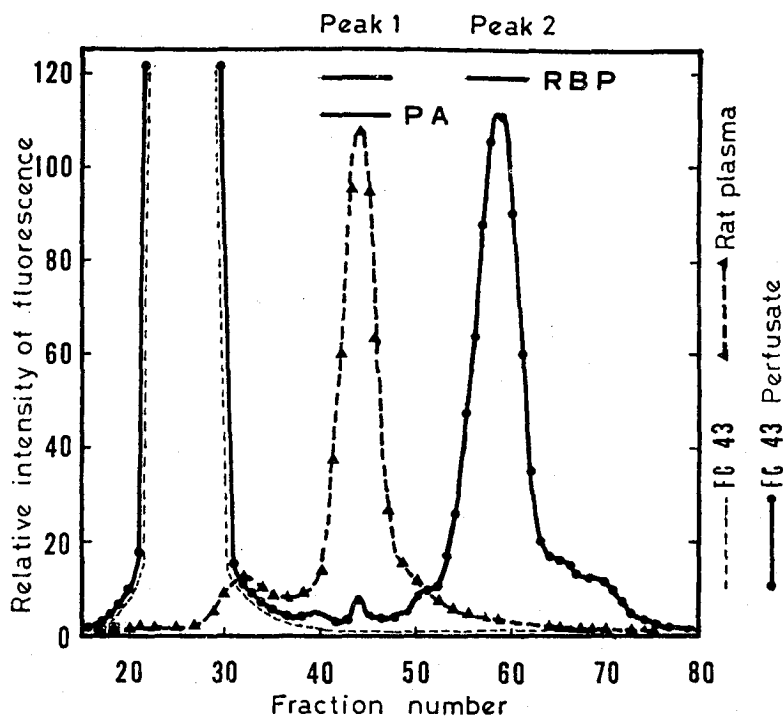


Fig.10. Chromatography on Sephadex G-100 of the perfusate.

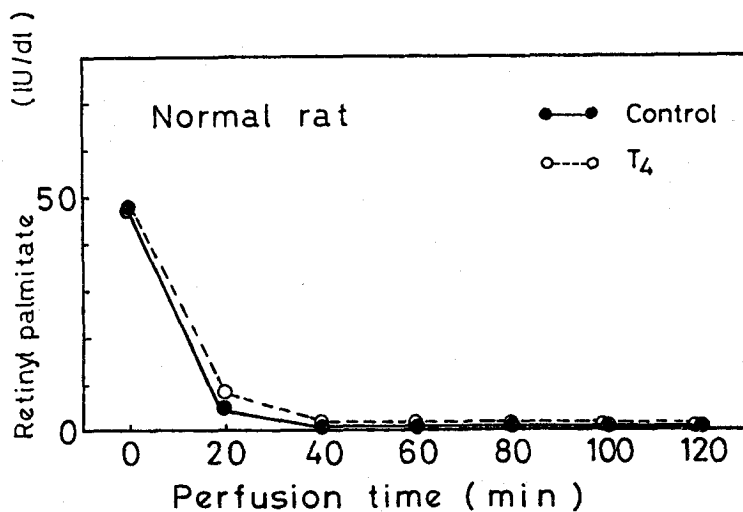


Fig.11. Effect of  $T_4$  on retiny palmitate uptake from the perfusate.

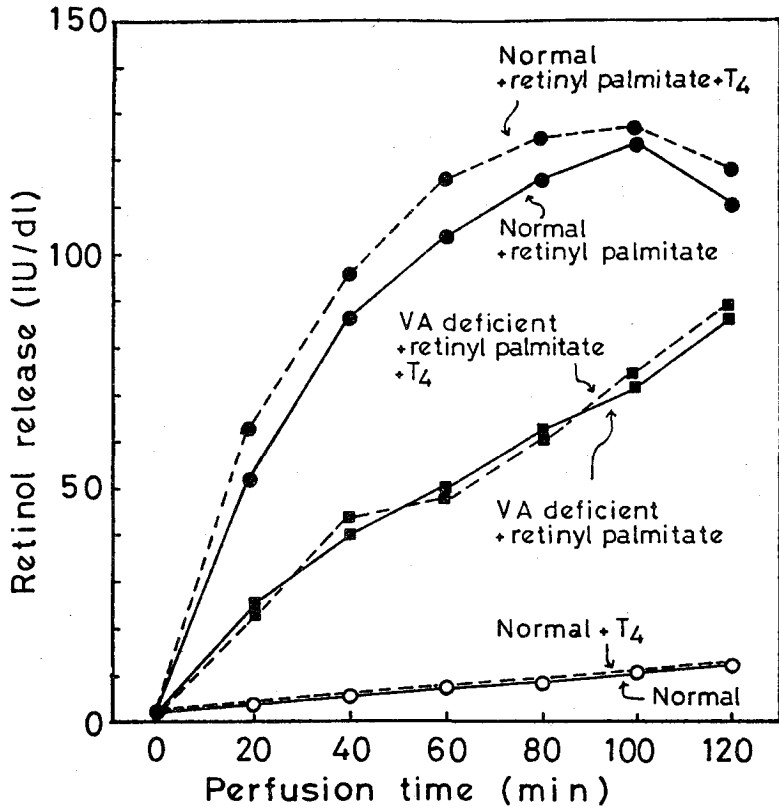


Fig.12. Effect of T<sub>4</sub> on retinol release from the livers perfused.

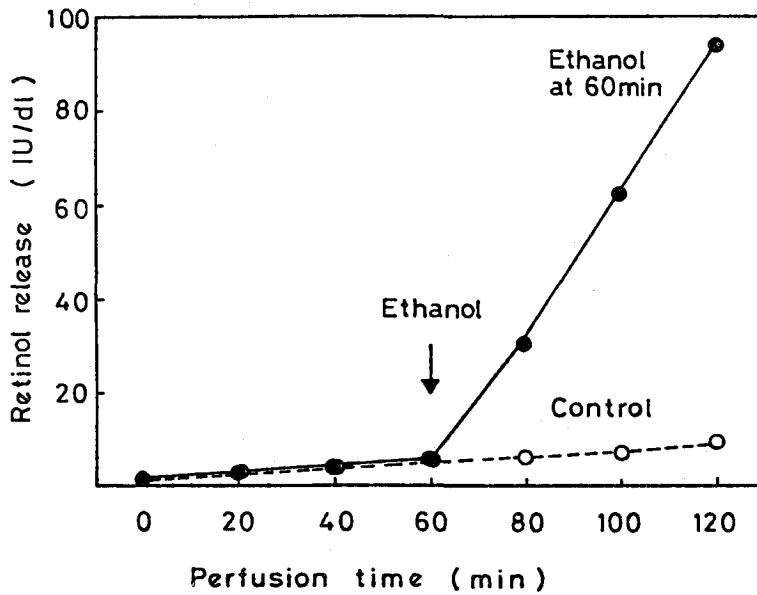


Fig.13. Effect of ethanol on retinol release from livers perfused.

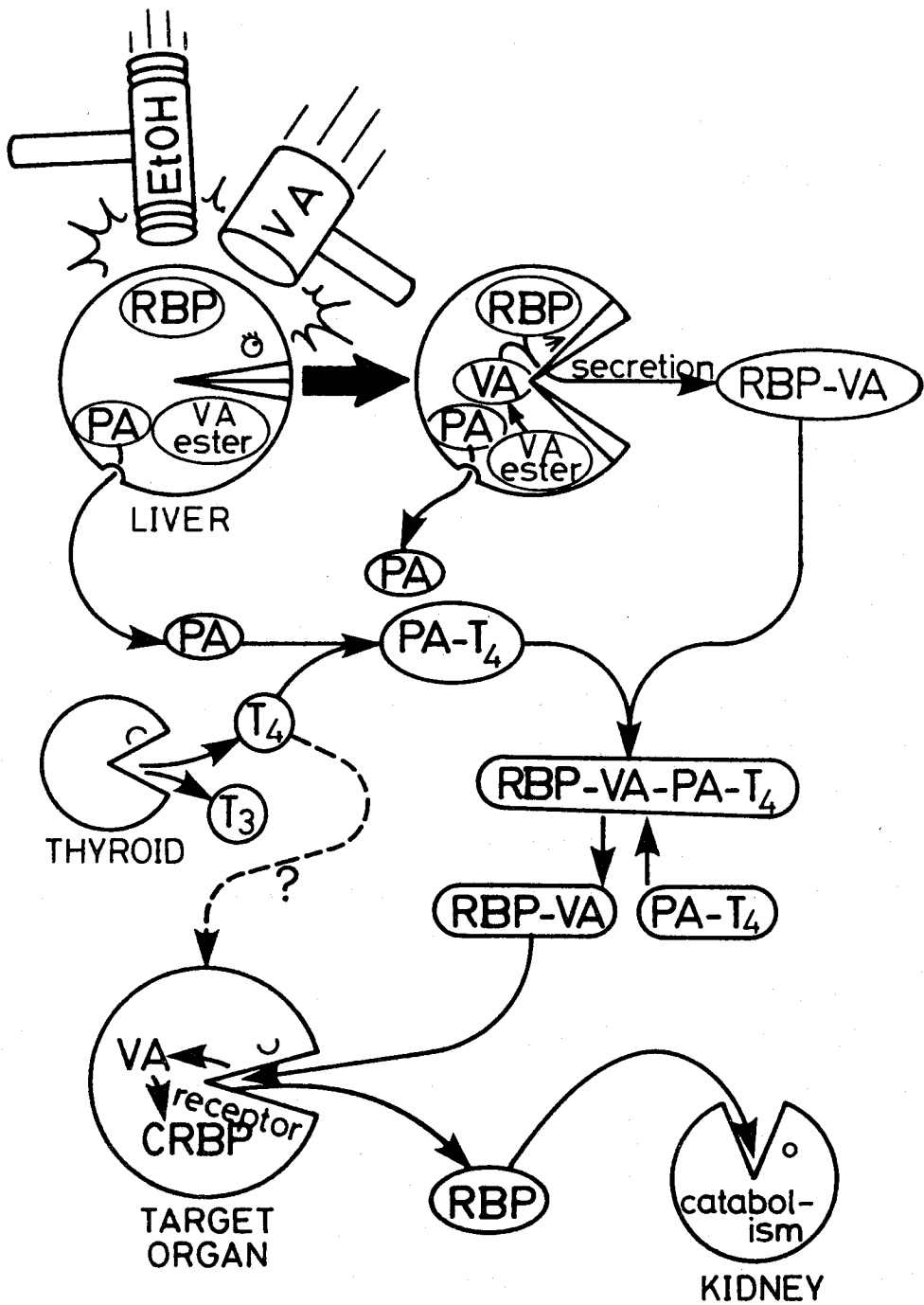


Fig.14 . Control of hepatic release of vitamin A and effect of thyroid function on vitamin A metabolism.

## 審 査 結 果 の 要 旨

ビタミンA (VA) はその特異的キャリアたんぱくである retinol-binding protein (RBP) に結合して血中を転送され標的器官に運ばれる。しかるに血中では, RBPの一部は甲状腺ホルモンの結合たんぱくの一つとして知られる thyroxine-binding prealbumin (PA) と1:1のモル比で結合しRBP-PA複合体として存在している。このことは, 甲状腺機能がVA代謝と何らかのかかわりのあることを示唆している。このことに着目してすでに大庭らは, VA欠乏時における甲状腺機能の低下, 血中 thyroxine ( $T_4$ ) レベルの低下などを報告している。

著者は, まず第1章でこの点を再確認するための実験的な検討を行い, 明らかに甲状腺機能とVA代謝が相互にかかわっていることを示した。次に, 第2章においてはVAの生体内動態を把握するため, ラット血清からRBPを精製するという困難な障害を克服してその抗血清を作製しRBPの免疫定量法を確立した。これを用いてVA欠乏ラットの血中VAおよびRBPの生体内動態を追跡した。すなわちVA欠乏からVA投与による回復の過程を観察すると, VAレベルの response はきわめて早いのに比べ $T_4$ レベルのそれは遅いことがわかった。また更に欠乏に戻すと, VA, RBP,  $T_4$ とも明らかに低下することがわかった。欠乏に戻すとVA, RBP,  $T_4$ とも明らかに低下することから肝臓からのVA分泌にはこの三者がそれぞれ異なるプロセスで関係していることが示唆された。

さて, 第3章において著者は肝臓を中心とするVAの代謝を検討するためMortimore型 還流装置を自作し, in situにおけるVAの動態について検討した。その結果VA欠乏肝および正常肝のいずれもが retinyl palmitateを速やかにとり込むとともに, この retinylpalmitateの還流液への添加が, 肝臓からRBP-VAを分泌するメカニズムの鍵になっていることが明らかにされた。肝臓から分泌される retinolの形態がRBP-VAでありPAと複合体をつくるのは肝臓から分泌されたのち血管内で行われることが実証された。また, 還流実験により甲状腺ホルモンは直接に肝臓のVA代謝に関与しているのではなく, 二次的なものであることも推測された。なおエタノールも何らかの機作で肝臓中からのVA分泌を促すことがわかった。

以上のように本研究はビタミン学の分野に新たな知見を加え寄与するところ大である。よって農学博士の学位を授与するに十分な資格があると判定した。