

果について検討し次の結果を得た。

- 1) 標準食飼育時における発育効果は地蜂幼虫添加により顕著な発育促進を示した。
- 2) 低蛋白食飼育時の対照群では発育が停止したが、地蜂幼虫添加群では軽度ながらも発育効果が見られた。
- 3) ビタミン欠乏食飼育時における対照群では体重の減少を示し、24日以後には全例死亡したが地蜂幼虫添加群では発育効果が見られ、標準食に添加した場合のそれとほぼ同程度の効果が認められた。

文 献

- 1) G. Kitzes, H. A. Schuette : J. Nutrition, **26**, 241 (1943)
- 2) 渡辺, 後藤 : 薬誌, **74**, 157 (1954)
- 3) 小山, 飯塚 : 栄養と食糧, **13**, 114 (1960)
- 4) 石黒, 内藤, 田中 : 栄養と食糧, **16**, 127, 129 (1963)
- 5) H. Rembold : Naturwiss, **3**, 49 (1964)
- 6) 石黒, 内藤, 原田 : 岐薬大紀要, **13**, 17 (1963)
- 7) 石黒, 内藤, 野口, 青木 : 岐薬大紀要, **13**, 31 (1963)

石黒伊三雄・長村洋一・高橋保志：ラット毛髪からの L-Kynurenine の簡易調製法

Isao Ishiguro, Yoichi Nagamura and Yasushi Takahashi :
A Simplified Preparation Method of L-kynurenine
from Rat Hair

(Received October 8, 1970)

Summary

L-kynurenine was isolated in a pure crystalline form from rat hair. L-kynurenine which was extracted from rat hair at hot water was separated with Sephadex G-10 and crystallized from ethanol. The rat hair was very useful for a simplified preparation of L-kynurenine, for hair of 30 g yielded 120 mg.

1925年古武¹⁾らによって発見された L-Kynurenine (L-Ky.) は Tryptophan (Try.) 代謝の端緒となり、今日まで L-Ky. を中心とした研究により Try. 代謝の詳細が解明されると共に Ky. は重要な中間代謝産物の一つであることがわかった。

この Ky. は Butenandt^{2)~4)} によって構造が確立され、昆虫の眼及び卵色素である ommochrome の生成母体となることが証明されて遺伝生化学的に注目されるようになった。一方高等動物の Try. 代謝の研究は中間代謝産物の分布や酵素化学的研究により Ky. の存在が認められたけれども高等動物の体内に多量存在するという報告はみられなかった。しかし、1959年石黒^{5)~8)}は Ky. がラットの毛髪に極めて多量蓄積することを発見し、その存在意義について研究している。この特異な現象は遺伝子の欠損や酵素活性の抑制などによるものではないことから比較生化学的な立場から興味ある事実である。著者らはこのような Ky. が高濃度に含有されているラットの毛髪から Ky. を簡易に調製する方法を考案した。

従来から Ky. の調製法は色々と報告されているが、Ky. 発見当初松岡、吉松らによって Try. 投与家兔尿中から Ky. が抽出分離され、その化学構造の研究に用いられたのが最も良く知られている。この分離法は Try. 投与尿から抽出するもので操作が複雑で収量も悪い。其の後早石らは *Pseudomonas. Sp* 菌より調製する酵素的手段による方法を報告している。又化学的な方法としては目らによる O-nitrobenzoic acid を原料とした合成法や Wernell, Berg の Try. をオゾン分解する方法がある。また橋本はラット毛髪から L-Ky. を調製する方法について述べているが、これは Crammer 法を応用したもので大量処理に不適合で、得られた結晶の純度が悪いため実際の使用には再結晶を行なわねばならず、結果的には収量が非常に少ない。このように Ky. の調製法は既に多く報告されているがそれぞれ操作上難点があり、容易に天然型の Ky. を簡易な方法で収率よく得る方法は少ない。著者らはラット毛髪から Sephadex G-10 を用い極めて簡単に L-Ky. を調製する方法を見出し、得られた結晶が高純度であることを確かめたので報告する。

実験成績

1. ラット毛髪から L-Ky の調製法

正常なラット毛髪の L-Ky. は Bratton-Marschall 反応によって定量すると 7~8mg/g の高濃度に含まれていることが知られている。著者らは各種実験に使用したラットから毛髪を抜き取っておき、これを材料として Fig. 1 に示す手順で L-Ky. を調製した。

1) ラット毛髪の前処理及び L-Ky. の溶出

ラット毛髪約 30g を 200~300 ml のエーテルで脱脂洗滌し、乾燥後約 700 ml の水で 70°C, 30 分間温水で浸出する。これによって Ky. は極めて速やかに溶出されるので同様操作を 4 回繰り返えし得られた浸出液を全部集める。この浸出液約 2,500ml は減圧濃縮して 20~30ml とする。この濃縮液を硫酸で pH 5.0 として一夜放置すると Kynurenic acid, 蛋白などが沈澱する。これを遠心分離によって除き、黄褐色の透明な濃縮液が得られる。

2) Sephadex G-10 による L-Ky. の Fractionation

この濃縮液は次に Sephadex G-10 (1.8×120 cm) を用いて水にて fractionation した。この際、Ky. は Sephadex G-10 に可成り吸着され他のものと容易に分離されることが分った。各 fraction は 10 ml 宛分取し、これを Ky. の特異の吸収帯である 365 m μ の O.D と Bratton-Marshall 反応によつて比色定量すると Fig. 2 に示すような溶出曲線が得られ、L-Ky. は完全に分離された。このうち明らかに Ky. が含有される fraction No. 18~No. 25 を分取してこれを全部集め、この液を再び減圧濃縮して放置すると黄色鱗片状の結晶が析出する。

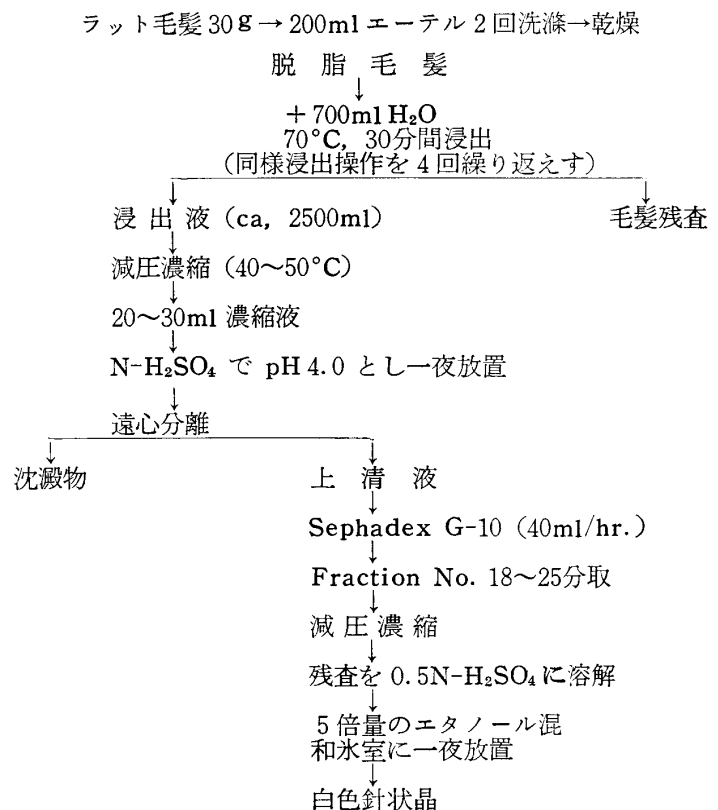


Fig. 1 ラット毛髪より L-Kynurenine の簡易調製法

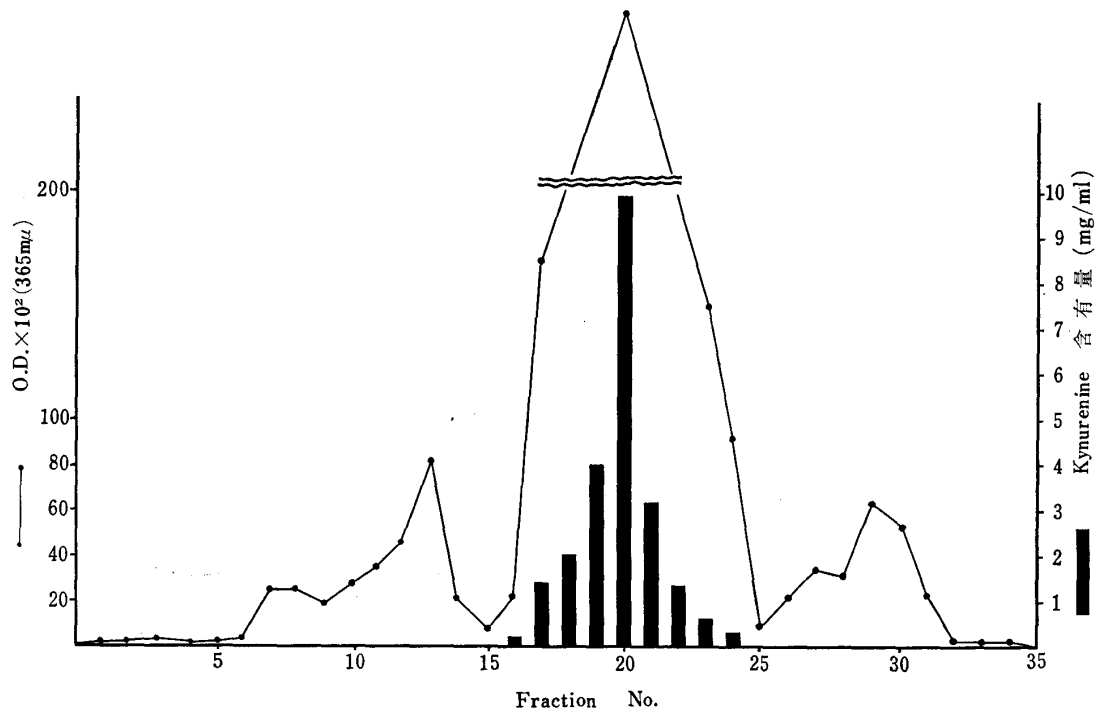


Fig. 2 Sephadex-G-10 による L-Kynurenine の Fractionation について

3) L-Ky 硫酸塩の調製

この結晶は汙別され、結晶を溶かし得る最少量の 0.5 N-H₂SO₄ に溶解し、これに 5 倍量のエタノールを混和後放置すると針状晶が析出する。析出した結晶は集められ、70%エタノールから再結晶すると 180 mg (L-Ky. として 120 mg) の白色針状晶を得る。毛髪中の Ky. 含量から計算すると収量は約 70%に相当する。

2. ラット毛髪から調製した L-Ky 硫酸塩の化学的性状について

本調製法に従ってラット毛髪から得られた L-Ky. 硫酸塩は別法で調製した標品と 2, 3 の化学的性状について比較し、表 1 に示す結果が得られた。すなわち、結晶形は何れも白色針状晶で両者共融点がなく 185°C 附近から褐色となり 195°C で発泡分解する。また UV スペクトルにおいてもよく一致し、中性及び 0.1 N-NaOH では両者共に 230

Table. 1 ラット毛髪より調製した L-Kynurenine 硫酸塩の性状

		標品 L-Kynurenine 硫酸塩	ラット毛髪より調製した L-Kynurenine 硫酸塩
結晶形		白色針状晶	白色針状晶
分解点		195°C	194°C
紫外部吸収帯		230, 257, 360mμ	230, 257, 360mμ
分子吸光係数		4.53 × 10 ³	4.38 × 10 ³
元素分析値		C : 37.08%, H : 4.37% N : 8.61% (理論値)	C : 36.96%, H : 4.96% N : 8.61%
P. P. C. における各種展開溶媒に対する Rf 値*	I	0.39	0.39
	II	0.45	0.45
	III	0.63	0.63

* 展開溶媒 I. n-BuOH : HAc : H₂O (4 : 1 : 1), II. MeOH : BuOH : Benzene : H₂O (2 : 1 : 1 : 1), III. 5% NaAc

$m\mu$, $257 m\mu$, $360 m\mu$ に吸収帯を示し, $0.1 N-HCl$ では $360m\mu$ の吸収帯が消失した. 元素分析値は表に示すように理論値と 0.3% 以内において一致する. 次に各種展開溶媒におけるペーパークロマトグラフィーの R_f 値は3種の展開溶媒に対する R_f 値が何れも標品の R_f 値と同一の値でしかもペーパー上何れも単一の蛍光スポットのみを示した. また両者の赤外吸収スペクトルについては Fig. 3 に示すようによく一致している.

以上の結果からラット毛髪から調製された L-Ky. は高純度のものであることが確認され, 生化学的実験に十分に役立つ物質である.

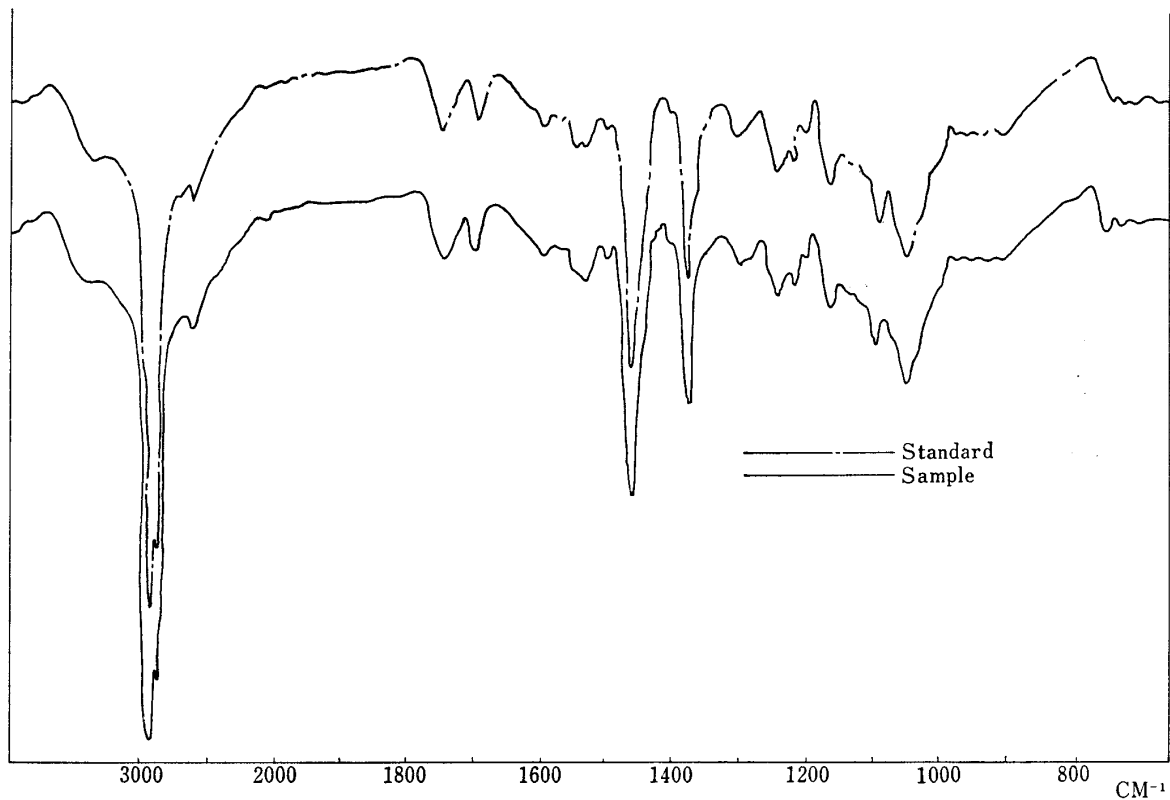


Fig. 3 I. R. Spectrum of Kynurenine

要 約

この L-Ky. 調製法は従来の方法に比較して, 操作が簡単で, 極めて高収量に得られる. 又この L-Ky. 硫酸塩は 2, 3 の化学的性状から極めて高純度なものであることを確認した. そして十分に生化学的実験に供することができる物質である.

文 献

- 1) Kotake. Y and Iwao J. : *Z. Physiol. Chem.* **195**, 195 (1931)
- 2) Butenandt. A : *Angew. Chem.* **54**, 89 (1941)
- 3) Butenandt. A : *Naturwissenschaften* **28**, 63 (1940)
- 4) Butenandt. A : *Angew. Chem.* **69**, 16 (1957)
- 5) 石黒, 堀田ら : *生化学* **32**, 28 (1960)
- 6) 石黒, 堀田ら : *生化学* **32**, 423 (1960)
- 7) 石黒, 堀田ら : *生化学* **33**, 713 (1961)

- 8) 石黒, 堀田ら: 生化学 **33**, 716 (1961)
- 9) Matsuoka Z. and Yoshimatsu N. : Z. Physiol. Chem. **143**, 206 (1925)
- 10) Hayashi O. : Biochem. Preps. **3**, 18 (1953)
- 11) 目, 徳山: 日本化学会誌 **63**, 1945 (1942)
- 12) Warnell J. L. and Berg C. P. : J. Am. Chem. Soc. **76**, 1708 (1954)
- 13) Hashimoto. A : J. Biochem. **46**, 1393 (1959)
- 14) Crammer, J. L. : Nature **191**, 349 (1948)

石黒伊三雄, 池野武行, 林 敏広: ウサギ尿中糖の定量における
Somogyi-Nelson 法に対する NH_4^+ 阻害機作について

Isao Ishiguro, Takeyuki Ikeno and Toshihiro Hayashi :
The Inhibition Mechanism of NH_4^+ and on the Determination of
Glucose in Rabbit Urine by Somogyi-Nelson's Method

(Received October 9, 1970)

Summary

As the quantitative methods of sugar in urine and blood, Hagedorn-Jensen's, Benedict's, Fujita-Iwatake's, Somogyi-Nelson's methods are used. Because of the existence of impediment, reductive substances except sugar in urine, Somogyi-Nelson's method dose not be used for determination of sugar in urine. We investigated to clear the impediment, inhibitive mechanism of it on the Somogyi-Nelson's method, and to remove it from urine.

Ion exchange resins Dowex-50, Amberlite IRA-400 were useful to remove impediment NH_3 , and reductive substances except sugar from rabbit rine.

生体内における糖代謝は、主に血糖や尿糖などを測定することによって観察されている。従来から血糖の定量は一般に Hagedorn-Jensen 法¹⁾が用いられていたが近年 Somogyi-Nelson 法²⁾による比色定量が繁用され、また尿糖は Bertrand 法³⁾, Benedict 法⁴⁾, Fujii の法⁵⁾, Fujita-Iwatake 法など各種の方法が用いられているけれども感度、操作法の難易、再現性、共存物質の影響などが問題となり、尿中の微量定量には優れた方法とは言い難い。

著者らはウサギ尿中糖の定量実験を行っていた際、普通尿糖の定量によく用いられる Bertrand 法や Fujii の方法を用いたが、何れも微量の糖濃度の変化を観察するには感度も悪く、再現性に乏しい事から十分な目的を達することが出来なかった。そこで操作が簡便で感度がよく、再現性に富み、血糖値の定量に用いられている Somogyi-Nelson 法の応用を試みた。しかし本法を尿糖の定量に用いる場合には尿に含まれる糖以外の還元性物質など多くの妨害物質の影響により正確な値が得られず、その原因が尿に含まれる NH_4^+ による影響の大きい事を認めたので、 NH_4^+ の妨害作用機作について検討した。その結果、尿をイオン交換樹脂で前処理することにより、 NH_4^+ や糖以外の還元性物質が除去され十分に目的を達する事が分ったのでこれについて述べる。