

## 内因性食欲調節物質2-DTAおよび3-DPAの血中濃度の定量

岡崎国立共同研究機構 生理学研究所  
根本清次, 山本智矢, 藤田一郎

九州大学 医学部 第1生理  
清水宣明, 大村 裕

## 内因性食欲調節物質2-DTAおよび3-DPAの血中濃度の定量

岡崎国立共同研究機構 生理学研究所  
根本清次, 山本智矢, 藤田一郎

九州大学 医学部 第1生理  
清水宣明, 大村 裕

内因性有機酸の3, 4-dihydroxybutanoic acid (2-deoxytetronic acid:2-DTA) および2, 4, 5-trihydroxypentanoic acid (3-deoxypentonic acid:3-DPA) は, 絶食下のラット血中から見出した物質で, 絶食時の血中の相対量の変化について報告した<sup>1)</sup>. さらに, これらの物質の食欲調節作用についても, すでにいくつか報告している (図1)<sup>2~4)</sup>. すなわち2-DTA は, 摂食抑制作用を有し, 3-DPA は摂食促進作用を有する. 摂食中枢である視床下部外側野にあるブドウ糖感受性ニューロンの活動に対して, 2-DTA は抑制的に働き, 3-DPA は促進的に作用する<sup>3)</sup>. 一方, 満腹中枢である腹内側核にあるブドウ糖受容ニューロンに対しては, 2-DTA は促進的に3-DPA は抑制的に働く<sup>3)</sup>. そして脳の皮質や視床ニューロンに対しては無効である. これらの物質の作用機序を解明するため

には, その代謝経路を知る必要がある. 今回, その一序として, 血中より2-DTA および3-DPA をラクトンとして分離し, 高分解能ガスクロマトグラフィー法により血中濃度の定量を行なった.

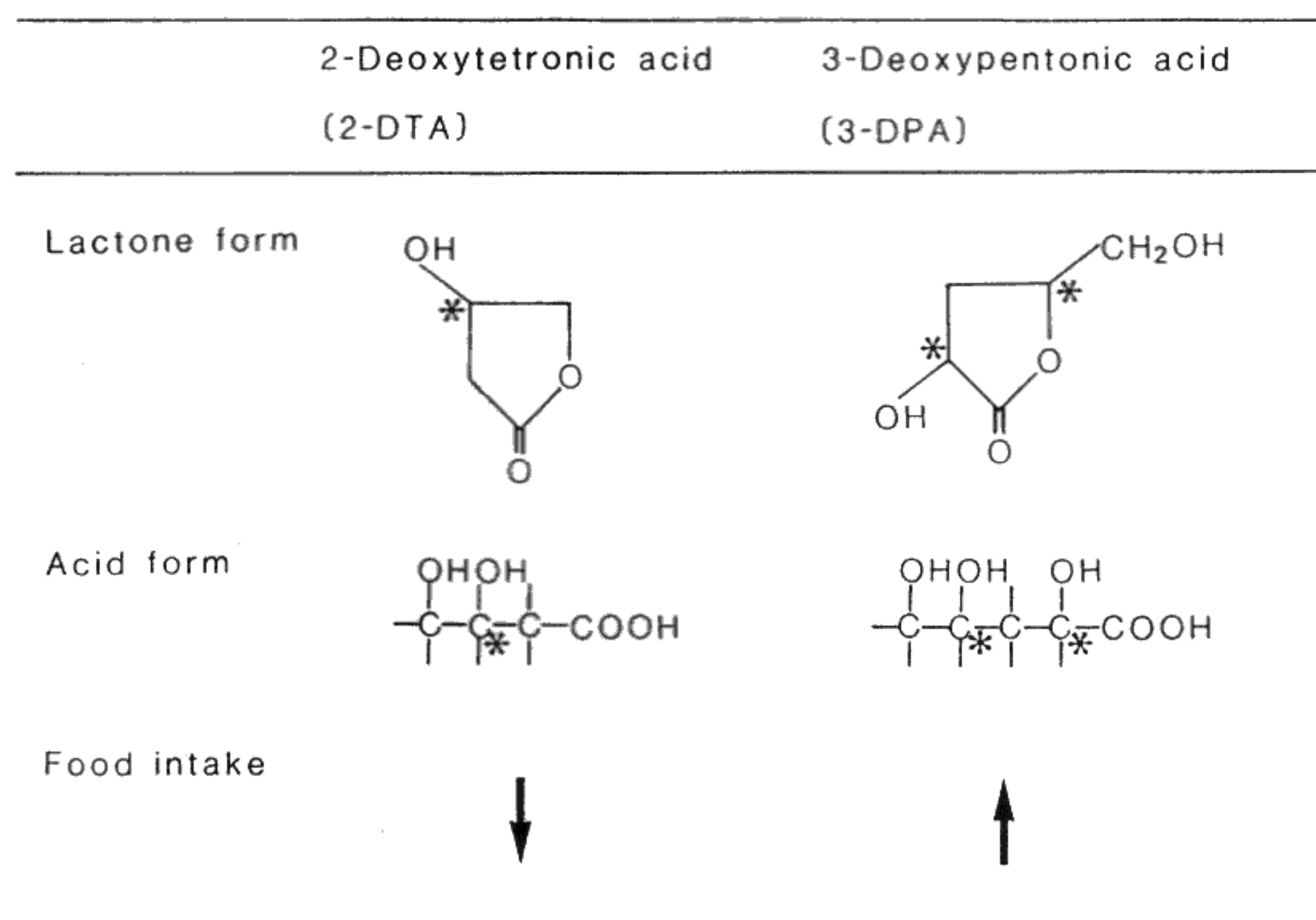


図1 2-DTA, 3-DPA の構造式と摂食に対する効果  
上段はラクトンの構造, 中段は酸の構造, 下段は摂食への効果を示す(\*:不斉炭素, ↑:促進, ↓:抑制).

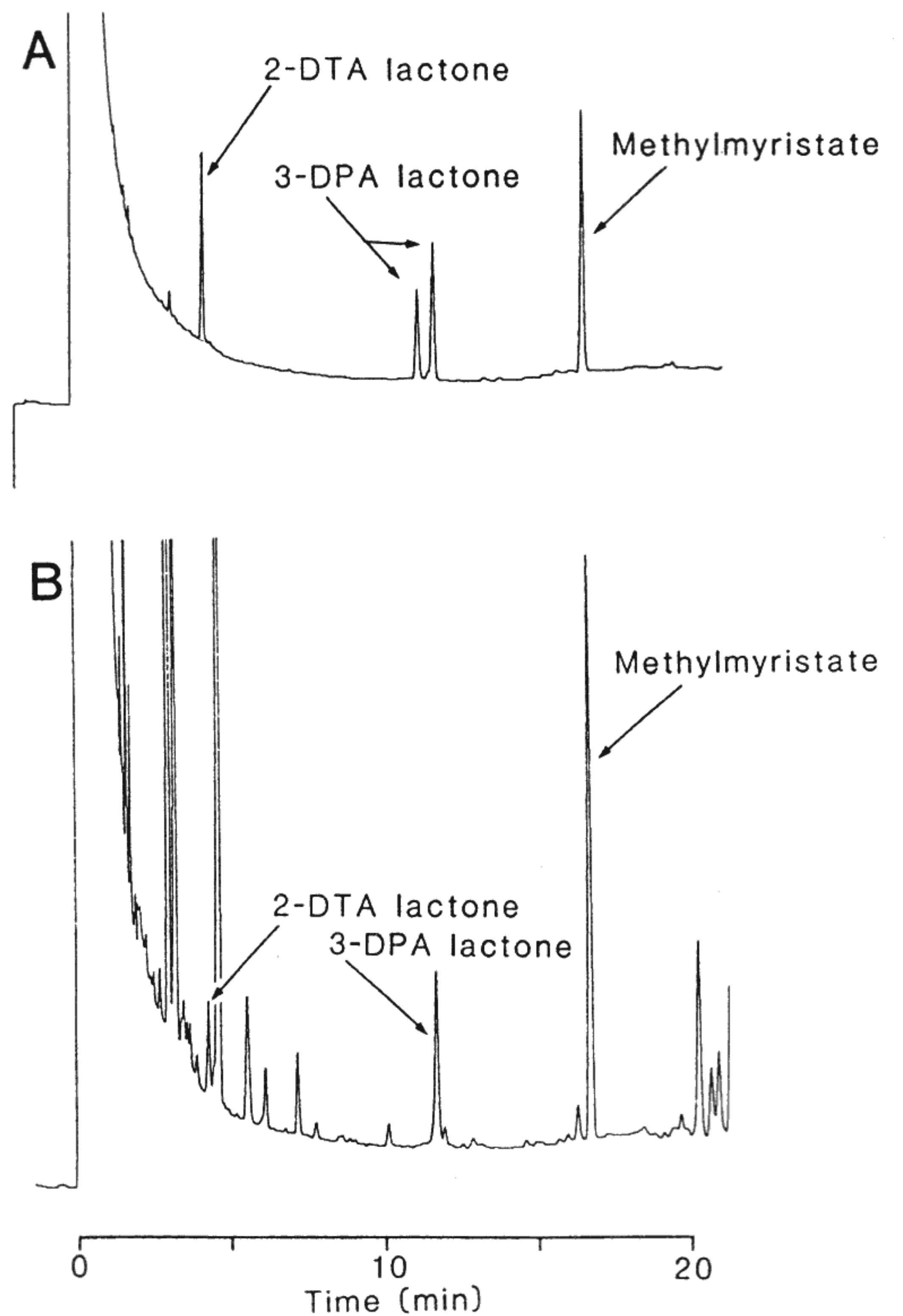


図2 標準試料(A)および分析試料(B)のクロマトグラム例  
どちらの例にも内部標準試料として, Methylmyristate を添加している.



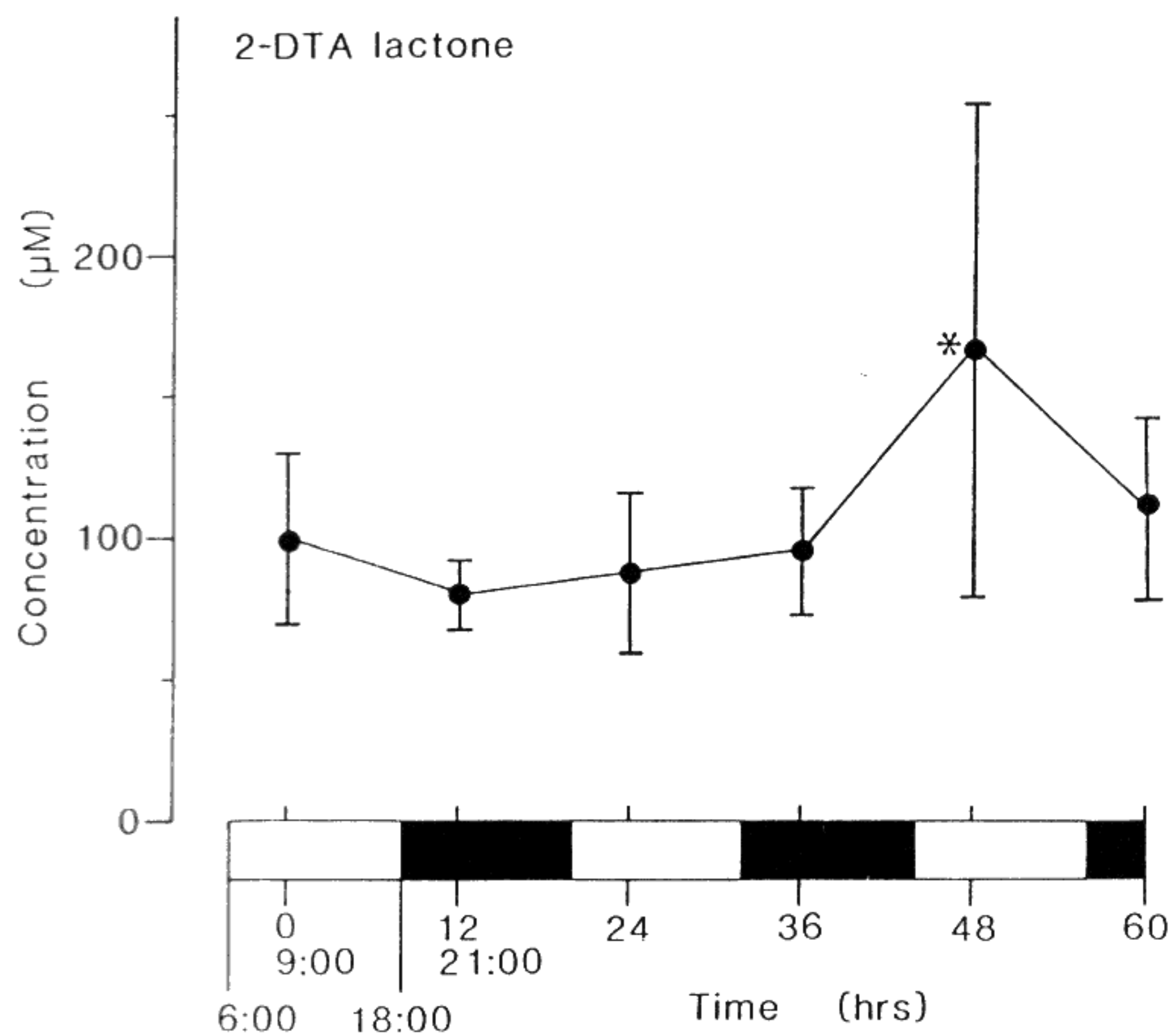


図3 絶食時における血中 2-DTA lactone の濃度変化  
平均±標準偏差, 11例(0 hr) または 7例(12~60hr).  
絶食後48時間で上昇の傾向がみられた(\*: Mann-Whitney's U-Test  $p < 0.1$ )

### I. 実験方法

体重350~400gのWistar系雄ラット11匹を、ネブタール(40mg/kg i. p.)で麻酔し、総頸静脈を切開の後、切開部より右心房内に至る慢性採血用カニューレを挿入した。さらにカニューレの反対側は皮下を経由して頭頂部に至り、皮膚を切開して頭頂より露出し、頭蓋骨にデンタルセメントを用いて固定した<sup>5)</sup>。1週間の回復期間の後、7匹と4匹の2群に分け、7匹を絶食群とし、他の4匹を正常摂食群とした。これら2群のラットすべてより、12時間毎に1匹当たり300 $\mu$ lの採血を行なった。血液はただちにヘパリン血漿化し、そのうち100 $\mu$ lを分析試料として用いた。分析試料はセントリフロー(CF-25: Amicon社)による除蛋白の後、イオン交換樹脂カラム(AG-1 $\times$ 4: BIO-RAD社、内径1cm、長さ8cm)に注入し、30mlの蒸留水で水分画を抽出した。次に、trimethylsilyl化を行なうため、抽出物を凍結乾燥の後、N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide 50 $\mu$ l, trimethylchlorosilane 5 $\mu$ l, およびpyridine 45 $\mu$ lとともに、65°C、15分間加熱した。反応物に、内部標準試料として methylmilstate を既知量、濃度として0.5~1.0mMとなるよう加えた後、ガスクロマトグラフ(GC-7A: 島津製作所)内に1~3 $\mu$ lを注入した。また、標準試料については、2-DTA lactone および 3-DPA lactone の 1 mM 水溶液100 $\mu$ lを乾燥

後、さらに trimethylsilyl 化の後、分析試料と同様の処理を行なった。カラムは、溶融シリカキャピラリーカラム(島津製作所、内径0.35mm、長さ50m)を使用した。カラム液相は予備実験で試みた OV-101, SE-30, および SE-52 のうち、最も良好な分離を示した SE-52 を用いた。なお、ピークの検出には水素炎イオン化検出器を使用した。クロマトグラムの記録およびデータの処理には、クロマトパック(CR-1: 島津製作所)を使用した。

### II. 結果

ガスクロマトグラムの1例を図2に示している。標準試料(A)では 3-DPA のピークの数 が 2 本であったが、分析試料(B)では 1 本であった。2-DTA のピークは標準試料および分析試料とも 1 本であった。ガスクロマトグラフィーによる最低感度は、2-DTA, 3-DPA ともに 0.5~1 pmole であった。また、分析試料に 2-DTA および 3-DPA を 100 pmole 添加して回収率を求めたところ、2-DTA では平均 65%, 3-DPA では平均 58% であった。

絶食前(0 hr)の 2-DTA の濃度は  $98.6 \pm 29.8 \mu\text{M}$  (平均±標準偏差, 11例)であった。絶食後36時間まで大きな変化はみられないが、絶食後48時間では  $167.7 \pm 80.8 \mu\text{M}$  (7例)となり、絶食前の濃度と比較して上昇を示した(Mann-Whitney's U-Test  $p < 0.1$ )。絶食後60時間では、濃度は再び絶食前の水準となった(図3)。なお、正常摂食群では、2-DTA の濃度は絶食に対応する60時間にわたって有意な変化を示さなかった(データは示していない)。一方、3-DPA の濃度は絶食前(0 hr)で  $327.9 \pm 224.7 \mu\text{M}$  (7例)であり、絶食後も各個体の 3-DPA 濃度は不規則に変動した。しかしながら絶食後12時間では  $480.8 \pm 267.5 \mu\text{M}$  (7例)であり、絶食前と比較して7例中6例に、上昇を認めた。

### III. 考察

現在の分析法による 2-DTA および 3-DPA の最低感度(0.5~1 pmole)を分析可能な濃度に換算すると、試料中の濃度は 0.1~0.2 $\mu\text{M}$  となり、今回の分析結果の最低値より十分小さな値である。液相については、SE-52 および OV-101 ともに分析可能であるが、SE-52の方がわずかに分離が良好であった。また、試料をシリル化することなく、SE-30カラム内に注入を試みた



が、ピークの十分な分離が得られなかった。

今回の分析方法では、2-DTA および 3-DPA は、すべてラクトンとして検出できた。水溶液中では、2-DTA および 3-DPA は、それぞれのラクトンと酸が混在すると考えられる。もし酸としての 2-DTA と 3-DPA が分析試料中に含まれるとすれば、イオン交換樹脂に吸着されると考えられるが、分析試料のギ酸分画について定性分析した結果、2-DTA および 3-DPA は検出できなかった。以上より血液中の 2-DTA および 3-DPA は、ラクトンとして存在している可能性が強い。

2-DTA および 3-DPA は、その分子構造に不斉炭素を有する(図1\*印)。2-DTA は 3R, 3S の 1組の鏡像異性体を持ち、3-DPA は 2R・4R, 2S・4S および 2S・4R, 2R・4S の 2組の鏡像異性体をもつ。図2のクロマトグラムによれば標準試料の 2-DTA ではピークが1本であり、3-DPA ではピークが2本存在するが(図2)、これは鏡像の関係にある異性体の物理的性質がきわめて近いため、2-DTA では 3R, 3S が1本のピークを示し、3-DPA では、2S・4S, 2R・4R が1本のピークを、同じく 2R・4S, 2S・4R が別の1本のピークを示していると考えられる。一方、実際の分析試料では 3-DPA のピークは1本であり、合成した 2R・4S および 2S・4R を用いて定性分析した結果によれば、分析試料のピークは 2R・4R または 2S・4S であることがわかった(未発表)。摂食に対する作用を各異性体について比較したわれわれの実験では、2-DTA では S 型だけが、3-DPA では 2S・4

S だけが強い生理活性を示した<sup>4)</sup>。以上の事実から血中の 2-DTA は S 型、また 3-DPA は 2S・4S 型であると考えられる。

2-DTA 濃度は絶食後48時間で上昇を示したが、今回 3-DPA 濃度は絶食後60時間にわたって有意な変化を見出すことはできなかった。これは絶食群の個々の数値に大きな偏差がみられ、絶食による変動を隠している可能性がある。動物個々の間に絶食以外の生理的状态に差があることが 3-DPA 濃度の偏差の原因であったとすれば、摂食条件のみならず、血糖値、遊離脂肪酸、ケトン体あるいはペプチドホルモンなどの内因性化学物質との相関を検討する必要がある。現在 3-DPA についてはさらに検討中である。

謝辞：標準試料を合成・提供してくださいました、奥門信久助教授(九州大学理学部)に感謝いたします。また、分析法について援助・指導いただきました鈴木学博士(北九州市環境衛生研究所)に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) T. Sakata, Y. Oomura, et al.: Brain Research Bulletin, **51**: 23~28, (1980).
- 2) K. Terada, Y. Oomura, et al.: J. Physiol. Soc. Japan, **47**: 307, (1985).
- 3) N. Shimizu, Y. Oomura, T. Sakata: Amer. J. Physiol., **246**: 542~550, (1984).
- 4) N. Shimizu, Y. Oomura, et al.: J. Physiol. Soc. Japan, **46**: 187, (1984).
- 5) A. B. Steffens: Physiol. Behav., **4**: 833~836, (1969).