

ビタミンA投与羊における血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度の定量

誌名	滝川畜産試験場研究報告
ISSN	03892271
著者	仙名, 和浩
巻/号	24号
掲載ページ	p. 13-19
発行年月	1988年12月

ビタミンA投与羊における血漿中レチノール 及びレチニルパルミテート濃度の定量

仙名 和浩

要 約 グラジェント逆相高速液体クロマトグラフィーによりめん羊血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度を定量した。定量の重複再現性 (CV 値) は、レチノールが平均濃度 $37.39\mu\text{g R Eq/dl}$ (中濃度域) 及び $50.32\mu\text{g R Eq/dl}$ (高濃度域) でそれぞれ 1.07%, 0.93%, レチニルパルミテートが平均濃度 $0.632\mu\text{g R Eq/dl}$ (低濃度域) 及び $24.93\mu\text{g R Eq/dl}$ (中濃度域) でそれぞれ 5.05%, 1.73% であった。血漿量を $250\mu\text{l}$ とした時の定量限界 (SN 比 = 5) はレチノール, レチニルパルミテート共に $0.23\mu\text{g R Eq/dl}$ であった。体重 1 kg 当たり 6 mg R Eq のビタミン A をめん羊に経口投与したところ (n = 3), 投与前及び投与 6 時間後の血漿中レチノール濃度は $34.60 \pm 2.29\mu\text{g R Eq/dl}$ (平均 \pm S. D.) から $48.27 \pm 3.06\mu\text{g R Eq/dl}$ に, 血漿中レチニルパルミテート濃度は $0.727 \pm 0.665\mu\text{g R Eq/dl}$ から $21.17 \pm 3.09\mu\text{g R Eq/dl}$ に上昇した。めん羊血漿中には, レチニルパルミテート以外のレチニルエステルと考えられるピークが認められた。そのうちの 1 つは, ビタミン A の投与によりレチニルパルミテートよりも顕著な血漿中濃度の増高が認められた。

結 言

近年, ビタミン A の生理作用が医学領域で明らかにされると共に, 畜産分野でもその生理作用による家畜生産の増大や疾病予防を期待したビタミン A の大量投与がしばしば行われるようになった。このような家畜に対するビタミン A の適正利用技術の確立には, 単に投与量と生産値との因果関係のみを検討するのではなく, 投与後の体内動態及び細胞や組織における作用を解明していくことが必要である。

ビタミン A は経口的に摂取され, 腸管から吸収された後, レチニルエステルとして肝臓 (以下肝) に輸送, 貯蔵される。肝からビタミン A 要求組織・

細胞へは, レチニルエステルが加水分解を受けレチノールとなり肝で合成されたレチノール結合蛋白質 (retinol-binding protein, 以下 RBP) と結合して血液中に放出・運搬される。このような特徴的な体内動態のために血中濃度についても総ビタミン A としてでなく生理的意義の異なるレチノールとレチニルエステルとを分離して定量する必要がある。そこで本研究では, めん羊にビタミン A を大量投与した際の血漿中レチノール及び主要レチニルエステルであるレチニルパルミテート濃度の高速液体クロマトグラフィーによる定量を試みた。

材料及び方法

1. ビタミンAの定量

レチノール、レチニルアセテート及びレチニルパルミテート（以上シグマ，U. S. A.）を標準物質として用いた。また溶媒には和光純薬（日本）の液体クロマトグラフ用エタノール，メタノール，イソプロパノール，*n*-ヘキサン及びテトラヒドロフラン（以下各々EtOH，MtOH，IPA，*n*-Hex，THF）を用いた。

高速液体クロマトグラフ（以下HPLC）装置は600型マルチソルベント送液システム，U6K型ユニバーサルインジェクター，490型多機能検出器（以上ウォーターズ，U. S. A.）を用いた。カラムはノバパック C₁₈（4μm 粒径，3.9mm×15cm，ウォーターズ，U. S. A.）を使用した。

定量は，レチニルアセテートを内部標準物質（以下IS）として用いる¹⁴⁾内部標準法によった。血漿からのビタミンAの抽出は，Bieri et al¹⁾，Driskell et al⁹⁾の抽出系を用い，血漿量を変更した⁹⁾。すなわち，血漿250μlを試験管にとり，ISのEtOH溶液を等量加え激しく混合した後，*n*-Hexを1ml加え1分間激しく混合した。次に2000回転，5分間遠心分離し，*n*-Hex層を約800μlとり，窒素気流で乾固，IPA50μlに再溶解しそのうちの25μlをHPLCに注入した。移動相は予備的にいくつかの条件を検討した結果，水・MtOH・THFの3液によるグラジェント移動相を用いることにした。初期条件（試料注入時）をMtOH：水=94：6（体積比，以下同様）とし9分後にMtOH：THF=85：15，9.8分後に最終条件のMtOH：THF=75：25になるよう直線的に変化させた。その後10.5分から0.5分間で初期条件に復帰させ，22分後までカラムの再平衡を行った。流速は1.5ml/分，カラムは40℃に保持した。溶離液はサンプルを注入後から5.4分まで325nm，5.4分から12分まで292nm，12分からは再び325nmでの吸光度を記録した。予め標準溶液により一定量の内部標準物質に対するレチノール及びレチニルパルミテートのピーク高さ比から検量線を作成した。次いでプールしたため

ん羊血漿を10回反復分析し，得られたクロマトグラムより各物質の濃度を決定し，これを標準血漿とした。各サンプルの定量はこの標準血漿によりその都度検量線を求め行った。

2. ビタミンAの大量投与

サフォーク種成雌羊3頭を用いた。供試羊は畜舎内で群飼し，1日1頭当たり1.8~2.0kgの乾草と150gのえん麦を給与し，自由飲水とした。ビタミンAの投与は体重1kg当たり6mg REq（REq：レチノール当量，1μg REq=3.33IU）を強制経口的に行い，投与前及び投与6時間後に頸静脈からヘパリン加真空採血管に血液を採取した。血液は遠心分離し，血漿をビタミンA測定時まで-20℃にて保存した。

結 果

本分離条件では，レチノールとレチニルアセテート（IS）は良く分離した（図1）。まためん羊血漿の分析では，レチノールとレチニルパルミテートの他に325nmで検出されるピークが認められた（図1中ピーク5，6，7）。それらのうち，ピーク5はレチニルパルミテートとの分離がやや悪かったが，分離能（Rs*¹⁾）は1.2程度でありレチニルパルミテートの定量には支障が無かった。

プール血漿を定量した際に得られた，本定量法の重複再現性を表1に示した。レチノールのCV値は血漿1（中濃度域）及び血漿2（高濃度域）でそれぞれ1.07%，0.93%，レチニルパルミテートのCV値は血漿1（低濃度域）及び血漿2（中濃度域）でそれぞれ5.05%，1.73%であった。SN比=5とした場合の定量限界はレチノール，レチニルパルミテート共に0.23μg REq/dlであった。

ビタミンA投与前後の血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度を表2に示した。ビタミンAの投与前の血漿中レチノール濃度は32.0~36.3μg REq/dlであった。ビタミンAの投与により6時間後で46.4~51.8μg REq/dlに上昇した。

ビタミンA投与前の血漿中レチニルパルミテ

* 1

$$Rs = 2 \times \frac{\text{ピーク b の保持時間} - \text{ピーク a の保持時間}}{\text{ピーク a の幅} + \text{ピーク b の幅}}$$

ト濃度は定量限界に近い
0.27~1.49 $\mu\text{g R Eq/dl}$ であった。
ビタミン A の投与により著しく増
加し、6 時間後で18.4~24.5 $\mu\text{g R}$
Eq/dl となった。

レチニルパルミテートより遅れ
て溶出された未知ピークの高さは、
ビタミン A 投与によって明らかに
増加し、その内のピーク 7 の増加
率はむしろレチニルパルミテート
よりも大きかった (表 3)。

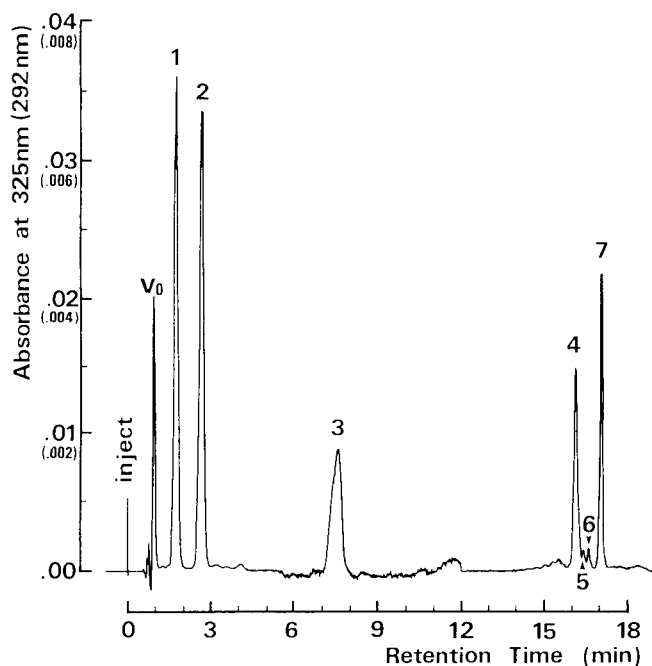


図 1 ビタミン A 大量投与羊血漿の分析例

このクロマトグラムはビタミン A 投与後 6 時間のめん羊血漿を分析したものである。V₀ はボイドボリューム、ピーク 1 はレチノール、2 はレチニルアセテート (内部標準)、3 は未同定だが恐らく α -トコフェロール、4 はレチニルパルミテート、5、6 及び 7 は未同定だがレチニルエステルの可能性がある。なお分析の 0~5.4 分及び 12 分~終了までは 325nm、5.4 分~12 分は 292 nm で吸光度をモニターし、ベースラインは 490 型多機能検出器によって補正している。

表 1 めん羊血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度定量の重複再現性

	レチノール ($\mu\text{gREq/dl}$)		レチニルパルミテート ($\mu\text{gREq/dl}$)	
	血漿 1 (中濃度域)	血漿 2 (高濃度域)	血漿 1 (低濃度域)	血漿 2 (中濃度域)
	38.2	50.3	0.66	25.3
	37.5	49.8	0.65	24.8
	37.3	50.5	0.69	25.6
	37.0	50.1	0.63	24.8
	37.7	49.4	0.65	24.9
	37.5	50.3	0.60	24.8
	36.9	50.8	0.63	24.2
	37.5	51.0	0.62	24.5
	36.9	50.6	0.61	24.9
	37.4	50.4	0.58	25.5
平均	37.39	50.32	0.632	24.93
σ_{n-1}	0.3985	0.4686	0.0319	0.4321
CV%	1.07	0.93	5.05	1.73

表2 ビタミンA投与前後の血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度

	めん羊No.	投与前($\mu\text{gREq/dl}$)	投与6時間後($\mu\text{gREq/dl}$)
レチノール	1	35.5	46.6
	2	36.3	51.8
	3	32.0	46.4
	平均	34.60	48.27
	σ_{n-1}	2.29	3.06
レチニル パルミテート	1	0.27	24.5
	2	0.42	18.4
	3	1.49	20.6
	平均	0.727	21.17
	σ_{n-1}	0.665	3.09
レチノール+ レチニル パルミテート	1	35.8	71.1
	2	36.7	70.2
	3	33.5	67.0
	平均	35.33	69.43
	σ_{n-1}	1.65	2.15

表3 ビタミンA投与前後におけるレチニルパルミテート、
ピーク5、6及び7のピーク高さの推移

	めん羊No.	投与前* ¹	投与6時間後	増加率* ²
レチニル パルミテート	1	1	89.9	89.9
	2	1.6	67.4	43.4
	3	5.5	75.6	13.9
ピーク5	1	ND* ³	10.8	—
	2	ND	8.1	—
	3	ND	9.5	—
ピーク6	1	ND	11.5	—
	2	ND	8.6	—
	3	ND	9.2	—
ピーク7	1	1.2	171.0	143.5
	2	2.1	159.8	72.8
	3	6.0	134.8	22.4

*1：めん羊1のビタミンA投与前のレチニルパルミテートのピーク高さを1としたときの各ピークの高さで、内部標準による補正済み。*2：投与6時間後値÷投与前値。*3：検出されず。

考 察

本定量法は定量限界に近い低濃度域を除き、極めて再現性の高いものであった。一般に内部標準法を用いた HPLC による血漿中レチノール及びレチニルエステル濃度の定量精度は高く、多くの報告で CV 値が 1～4% を示す^{1,2,3,9)}。しかし、それらの多くは単一濃度移動相によるものである。今回再現性が問題とされるグラジエント移動相によっても、十分な定量精度が得られることが確かめられた。

本研究においてビタミン A をめん羊に大量経口投与すると、数時間の内に血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度が上昇することが確認された。レチニルパルミテートの血漿中濃度の上昇は、ビタミン A が腸管から吸収された後、まずレチニルエステルとして血中に入るという機序によると考えられた。そして血漿中レチノール濃度の上昇は、ビタミン A 投与にともなうレチニルエステルの血漿中濃度の上昇が肝からの RBP の分泌を促し、二次的に生じたものと考えられる。すなわち、ビタミン A 欠乏ラットにレチニルエステルを経口投与すると、血中 RBP 濃度が急速に上昇すること⁶⁾、またビタミン A 含有カイロミクロンを静脈内投与するとその投与量に応じて肝から RBP が放出されることが認められることから⁷⁾、ビタミン A が RBP の分泌過程を調節していると考えられているからである⁷⁾。

一方、325nm で検出されるいくつかの未同定ピークがめん羊血漿中に認められた。これらのピークはビタミン A 投与によって明らかに血漿中濃度が上昇しており(表 3)、ヒトにおいてもビタミン A を経口投与した場合に、血漿中にはレチニルパルミテートの他に、いくつかのレチニルエステルが検出されている²⁾ことから、パルミチン酸以外の脂肪酸とのレチニルエステルと考えられた。このうちピーク 7 は、その溶出位置とヒトでもレチニルパルミテートに次いで血漿中濃度の高いことから²⁾レチニルステアレートと考えられた。本実験でピーク 7 はビタミン A の投与によりレチニルパル

ミテートよりも血漿中濃度の増加率が大きく、ビタミン A の大量投与時のビタミン A 吸収の上で重要なレチニルエステルと考えられた。ピーク 5 及び 6 もレチニルエステルと考えられるが、他の分離条件^{2,5)}での成績との相同からの同定は難しく、標準物質(レチニルパルミテート以外は市販されていない)による確認が必要である。

ところで、このようなビタミン A の投与に伴う血漿中レチノール及びレチニルエステル濃度の推移にはいくつかの要因が関与すると考えられる。すなわち第一点は、腸管からの吸収率であり、第二点は貯蔵臓器である肝へのレチニルエステルの取り込み率である。この両者がビタミン A 摂取レベルによって変動することが子羊で知られている³⁾。すなわち、腸管から血液中へのビタミン A の吸収率はビタミン A 欠乏子羊で高く、また吸収後欠乏子羊では血漿中ビタミン A はほとんどがレチノールとなるのに対し、過剰子羊ではほとんどが肝に取り込まれずレチニルエステルのまま血漿中に存在していることが認められている。第三点はレチノールとしての血中への分泌である。肝における RBP 合成の抑制もしくは低下はレチノール濃度を低下させる。その 1 例として、ヒトにおいて低蛋白質栄養状態におけるビタミン A 欠乏が知られている(Protein-energy malnutrition)⁸⁾。これは、蛋白質不足により RBP 合成が低下し、ビタミン A を十分摂取していても結合蛋白質の欠乏によりレチノールとして利用されないためである。

以上のように、ビタミン A 投与後の血漿中レチノール及びレチニルエステル濃度の推移を観察することによって、被投与個体のビタミン A 代謝の状態を推測することが可能と考えられる。そして、この目的のためのレチノール及びレチニルエステルの分別定量は意義が深く、今後の研究に欠かせないものである。さらに血漿中 RBP 濃度の定量も重要と考えられる。

謝 辞

本研究に当たり、HPLC装置を快く貸与下さった日本ミリポア・リミテッド ウォーターズクロマトグラフィー事業部に深謝する。

文 献

- 1) Bieri, J. G., Tolliver, T. J. and Catignani, G. L. (1979) *Am. J. Clin. Nutr.*, 32 : 2143-2149.
- 2) DeRuyter, M. G. and DeLeenheer, A. P. (1978) *Clin. Chem.*, 24 : 1920-1923.
- 3) Donoghue, S., Donawick, W. J. and Kronfeld, D. S. (1983) *J. Nutr.*, 113 : 2197-2204.
- 4) Driskell, W. J., Neese, J. W., Bryant, C. C. and Bashor, M. M. (1982) *J. Chromatogr.*, 231 : 439-444.
- 5) Furr, H. C., Cooper, D. A. and Olson, J. A. (1986) *J. Chromatogr.*, 378 : 45-53.
- 6) Muto, Y., Smith, J. E., Milch, P. O. and Goodman, D. S. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247 : 2542-2550.
- 7) 武藤泰敏 (1973) 代謝, 10 : 884-902.
- 8) 武藤泰敏, 森脇久隆, 二ノ宮三生, 河合潔 (1983) 内科, 52 : 1013-1018.
- 9) Nichoalds, G. E. (1983) *Clin. Chem.*, 29 : 708-712.

Simultaneous Analysis of Plasma Retinol and Retinyl Palmitate in Ewes before and after Oral Administration of Vitamin A.

Kazuhiro SEN-NA

(Received : Apr. 11. 1988)

Summary

Ovine plasma retinol and retinyl palmitate were determined simultaneously by reversed-phase gradient high-performance liquid chromatography. Under the selected analytical condition, within-day coefficients of variation (CV) were 1.07% and 0.93 % for retinol with means of $37.39\mu\text{g REq/dl}$ and $50.32\mu\text{g REq/dl}$, respectively. CV for retinyl palmitate were 5.05% and 1.73% with means of $0.632\mu\text{g REq/dl}$ and $24.93\mu\text{g REq/dl}$, respectively. In plasma ($250\mu\text{l}$), lower detection limit ($S/N=5$) was about $0.23\mu\text{g REq/dl}$ for both components. To three ewes, 6mg REq/kgBW of vitamin A was orally administered. Plasma concentrations of retinol and retinyl palmitate before administration of vitamin A were $34.60\pm 2.29\mu\text{g REq/dl}$ (mean \pm SD) and $0.727\pm 0.665\mu\text{g REq/dl}$, respectively. Plasma retinol and retinyl palmitate were increased to $48.27\pm 3.06\mu\text{g REq/dl}$ and $21.17\pm 3.09\mu\text{g REq/dl}$ at 6hours after administration of vitamin A, respectively. In addition to retinyl palmitate, several peaks considered to be retinyl esters were detected in ovine plasma. One of these peaks increased more remarkably than retinyl palmitate after administration of vitamin A.

