

表1 マウス QPRT 遺伝子検出用プライマー

name	プライマー配列 (5'→3')
S1	CGACACCTGGGTTCCGACTGGT
S2	GGACCTGCCCACCACCTGCTCT
S3	GTCCTGTTACCCCCTACAACC
S4	AGGTGGCAGAGGTCAAGGGACC
AS1	GGCTGCTACATTCCACCTCTAC
AS2	CCTGCCGAGCCTTCAGCACTGC
AS3	GTCCAGCATTACCAGGTCAGCC

表2 ネオマイシン耐性(neo)遺伝子検出用プライマー

name	プライマー配列 (5'→3')
F	TGGGCACAACAGACAATCGG
F2	AGCGAACCGGAATTGCCAGC
F3	CAAGACCGACCTGTCCGGTG
R	ACTTCGCCCAATAGCAGCCAG
R2	ACGCTATGTCCTGATAGCGGT
R3	CGACGAGATCCTCGCCGTCG

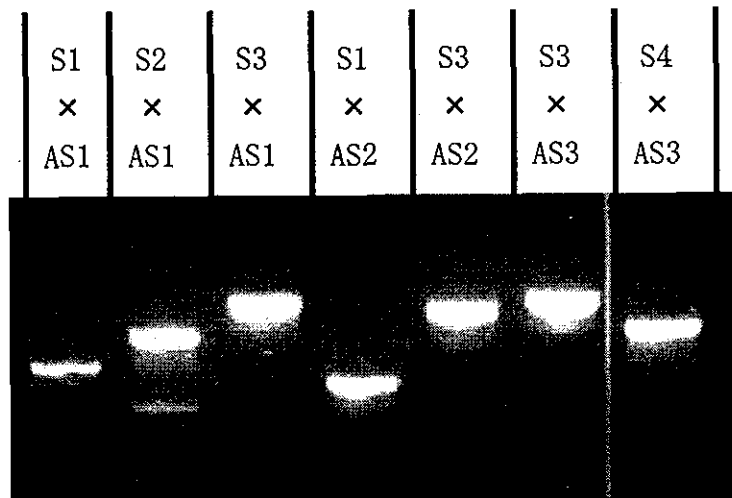


図3 QPRTase プライマーによる PCR 結果

S1×AS1、S2×AS1、S4×AS3 プライマーセットはアニーリング温度を 70 °C に設定。その他は 65 °C に設定。

S1×AS1、S2×AS1、S4×AS3 プライマーセットでは非特異的なバンドも検出された。

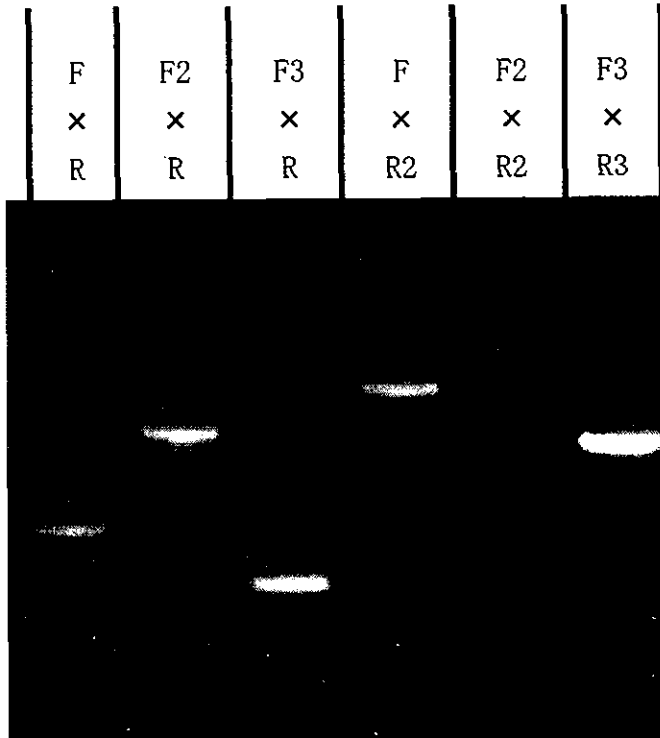


図4 neoプライマーによるPCR結果

すべてアニーリング温度を65 °Cに設定。

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

2. 水溶性ビタミンの測定法の検討 -ビタミンB₆-

分担研究者 早川享志 岐阜大学 教授

研究要旨

本研究に使用するビタミンB₆関連化合物の測定方法についてまとめた。

A. 目的

日本人の水溶性ビタミンの必要量を求めるためには、ヒトを用いた人体実験が主体となるが、ヒトで行う実験には限りがあり、動物を用いた動物実験による検討も並行して行う必要がある。そこで、ビタミン B₆ の評価に関して必要な測定法について食品サンプル、ヒトサンプル、ラットサンプルに関してビタミン B₆ 関連物質の測定法についてまとめ、今後の研究の基礎とする。

B. 実験方法

1. 微生物定量法による総ビタミン B₆ 量の測定法

1-1. 試薬

保存用培地 (斜面寒天培地) の作成

凍結 YM 保存培地は、酵母エキス 3.0 g, 麦芽エキス 3.0 g (いずれも Difco Laboratory 製), ポリペプトン (日本製薬株式会社製) 5.0 g, ブドウ糖 10.0 g をミリ Q 水 100 mL に溶解して調製した。凍結保存可能であるので凍結保存し、使用時にはこの培地を解凍後、希塩酸で pH5.0 とし、ミリ Q 水で 10 倍に希釈する。この希釈培地に寒天 3% (W/V) を加え加熱溶解後、6 mL ずつ試験管に分注し、シリコン栓をして 121°C で 15 分オートクレーブ滅菌をした後、斜め台に静置しスラント (傾斜寒天培地) とする。

接種菌液の調製

ビタミン B₆ 定量用菌株は *Saccharomyces cerevisiae* 4228 (ATCC 9080) を使用した。保存菌株用のスラントから新しいスラントに継代を行い、30°C で 20 時間程度培養する。ここから 1 白金耳の菌をとり、予め 121°C で 15 分オートクレーブ滅菌した生理食塩水 20 mL に懸濁する。

ビタミン B₆ 定量用培地

ビタミン B₆ 定量用基礎培地 (ニッスイ製薬株式会社) 6.5 g をミリ Q 水に溶解し、希塩酸で pH を 5.0 とした後、100 mL とする。

ピリドキシン標準溶液の調製

ピリドキシン塩酸塩 60.8 mg をミリ Q 水に溶解し、ミリ Q 水で 50 mL としたピリドキシン保存溶液 (ピリドキシンとして 1 mg/mL) をミリ Q 水で希釈してピリドキシン標準溶液 (1 ng/mL) とする。この濃度補正は、ピリドキシン保存溶液 0.5 mL に 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 10 mL を加え、ミリ Q 水で 20 mL とした希釈液について、325 nm あるいは 253 nm における吸光度を求め、 $\epsilon_{325} = 7,100$ あるいは $\epsilon_{253} = 3,700$ を用いて正確

な濃度を求め、ピリドキシン濃度を補正する。ビタミン B₆ は光に対して不安定であるので、ビタミン B₆ を扱う操作はすべて暗所あるいは薄暮照明の部屋で行い、試料溶液は褐色容器に入れ氷冷保存する。以下のビタミン B₆ を含むサンプルについては同様の注意を払う必要がある。

1-2. 分析試料調製方法

食品サンプルの場合

粉碎またはホモジナイズした試料 1 g を 100 mL 容の三角フラスコに採取する。植物性試料の場合は、0.44 M 塩酸 80 mL を、動物性試料の場合は、0.055 M 塩酸 80 mL を加えて 121°C (+1 気圧条件下) でそれぞれ 2 時間あるいは 5 時間オートクレーブする。常圧にまで圧力が下がったらすぐに取り出し冷却後 10 M 水酸化ナトリウムで pH5.0 として 100 mL に定容し、ひだ付濾紙 (ADVANTEC No. 5B) で濾過し、食品抽出液サンプルとして保存する (冷凍保存可能)。定量に際してはピリドキシンとして 1 ng/mL 程度にミリ Q 水で希釈する。なお、濾過する場合には、最初の濾過液は採取しないこと。

尿サンプルの場合

尿 (ラットおよびヒト) は回収後 1500 x g, 4°C で 10 分間遠心分離した上清を尿サンプルとし、-40°C で保存する。尿サンプル 1.0 mL に 0.055 M 塩酸を 80 mL 加え、121°C で 5 時間オートクレーブを行いビタミン B₆ を抽出する。得られた抽出液を 10 M 水酸化ナトリウムで pH5.0 に調整後、100 mL に定容し、ひだ付濾紙 (ADVANTEC No. 5B) で濾過する。これを尿抽出液サンプルとする (凍結保存可能)。定量する場合には、この尿抽出液サンプルをさらにミリ Q 水で適度に希釈する。

糞サンプルの場合

ラット糞については、ADVANTEC No. 2 濾紙を敷いたトレイ上に採取した糞を回収し -40°C で保存した後、24 時間凍結乾燥し、MILLSER (FOODS MILL, Iwatani) で粉碎する。粉碎糞 0.50 g に 0.055 M 塩酸を 40 mL 加え、121°C で 5 時間オートクレーブを行いビタミン B₆ を抽出する。得られた抽出液を 10 M 水酸化ナトリウムで pH5.0 に調整後、50 mL に定容し、ひだ付濾紙 (ADVANTEC No. 5B) で濾過する。これを糞抽出液サンプルとする (凍結保存可能)。定量する場合には、この糞抽出液サンプルをさらにミリ Q 水で適度に希釈する。

1-3. 総ビタミン B₆ 定量操作方法

定量の前日に保存菌株より新しいスラン

トへ継代を行い、30°Cで20時間培養する。各抽出液サンプル0.5 mL、ミリQ水2.0 mLを試験管に入れ、さらにビタミンB₆定量用培地(ビタミンB₆定量用基礎培地6.5 gをミリQ水に溶解し、希塩酸でpH 5.0に調整後、全量を100 mLとしたもの)を2.5 mL添加し、シリコン栓をして121°Cで15分間オートクレーブを行い滅菌する(測定培地)。あらかじめ菌を培養しておいたスラントから1~2白金耳の菌を取り、121°Cで15分間オートクレーブした滅菌生理食塩水20 mLに懸濁したものを接種菌液とする。滅菌した測定培地に接種菌液を30 µL添加し、恒温振とう器(Taitec Bio Shaker BR-30L)を用いて30°Cで20時間振とう培養(200 rpm)する。培養後10分間沸騰湯浴中で煮沸し、そのときの菌の生育度を分光光度計を用いて600 nmの吸光度にて測定する。

ビタミンB₆標準曲線は、試験管あたり0~2.0 ngピリドキシンの範囲で作成し、その回帰式を用いてサンプル中の総ビタミンB₆量を算出する。なお、ピリドキシンの0 ngの標準サンプルのうち1本には菌を添加せず培地ブランクとし、他の菌の混入がないことを確かめる。

計算方法

各試験管に含まれるピリドキシンの相当量(ng)を検量線より求め、使用した希釈率、使用した希釈抽出液サンプル量を考慮して抽出液サンプル1 mLあたりのピリドキシンの相当量から対象試料1 gあるいは1 mLあたりのピリドキシンの相当量を求める。

2. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析方法

2-1. 試薬

ピリドキシン(PN)、ピリドキサミン(PM)、ピリドキサール(PL)、ピリドキサミン5'-リン酸(PMP)、ピリドキサール5'-リン酸(PLP)および4-ピリドキシニン酸(PIC)は5 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)で500 nM溶液を調製し、標準溶液とする。

2-2. 分析試料調製方法

血漿過塩素酸(PCA)抽出液の調製

血漿(ラットあるいはヒト)1 mLに3 M過塩素酸(PCA)を0.5 mL加え、良く混合後、高速微量冷却遠心機MR-150(株式会社トミー精工)で10分間遠心分離(12,000 rpm, 4°C)を行いタンパク質の除去を行う。得られる上清に1.0 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)を0.4 mL加え、5 M水酸化カリウムにてpH 3.5に調整し、4 mLに定容したものをラット

血漿PCA抽出液とする。この血漿PCA抽出液2 mLを再び高速微量冷却遠心機MR-150(株式会社トミー精工)で10分間遠心分離(12,000 rpm, 4°C)し、塩を除去した後4 mLに定容する。これを0.45 µmのメンブランフィルターに通し、このうち200 µLを後述のB₆ビタマーのHPLC分析(HPLC分析条件A)に供する。

PLPはPCA抽出液そのままでは蛍光強度が低いため、定量することが難しい。そこで、KCN処理を行ってPLPを4-ピリドキシニン酸5'-リン酸(PIC-P)へ誘導化することにより蛍光強度を高めた後、別途高感度で定量する。そのためには、上記の血漿PCA抽出液2 mLを5 M水酸化カリウムでpH 7.5に調整し、高速微量冷却遠心機MR-150で10分間遠心分離(12,000 rpm, 4°C)を行い、塩を除去する。得られた上清に0.1 Mシアン化カリウム(KCN)100 µLを加え、50°Cで3時間振とうしながらインキュベートする。液温を常温に戻し、ラットの場合は、1 M塩酸でpH 3.5に、ヒトの場合は、0.1 M塩酸でpH 5.5に調整し、25°Cの恒温槽中で24時間放置する。放置後4 mLに定容し、0.45 µmのメンブランフィルターに通し、このうち200 µLをHPLC分析(ラットの場合はHPLC分析条件B、ヒトの場合はHPLC条件C)に供する。

母乳PCA抽出液の調製

母乳は採取後、すぐに-20°Cで凍結保管し、その後分析までは-40°Cで保存した。解凍後、緩やかに攪拌し、1 mLをとり、血漿の場合と同様にPCA抽出液を調製した。各B₆ビタマーはHPLC分析条件Aにより、PLPは、KCN処理後HPLC条件Bにより分析する。

ラット臓器PCA抽出液の調製

ラット臓器1 gあたり、3 mLの冷生理的食塩水を加えホモジナイザー(HG30 Homogenizer HITACHI Co., Tokyo, Japan)で緩やかにホモジナイズし、さらに5 MのPCA 1 mLを加えて再度緩やかにホモジナイズした後、高速微量冷却遠心機MR-150で10分間遠心分離(12,000 rpm, 4°C)を行いタンパク質の除去を行う。得られた上清に1.0 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)を0.6 mL加え、5 M水酸化カリウムにてpH 3.5に調整し、8 mLに定容する。この臓器PCA抽出液を再び高速微量冷却遠心機MR-150で10分間遠心分離(12,000 rpm, 4°C)し、塩を除去した上清を臓器PCA抽出液とする。臓器PCA抽出液の一部を0.45 µmのメンブランフィルターに通し、このうち200 µLをHPLC分析

(HPLC 分析条件 A) に供する。

臓器 PCA 抽出液中 PLP はラット血漿 PCA 抽出液と同様な方法により KCN 処理により PIC-P に変換後、HPLC 分析 (HPLC 分析条件 B) に供する。

尿 PCA 抽出液の調製

尿 (ラットあるいはヒト) は回収した後、10 分間遠心分離 (1,500×g, 4°C) を行い、その上清を尿サンプルとする。尿サンプル 1 mL に 3 M PCA を 0.5 mL 添加後、高速微量冷却遠心機 MR-150 (株式会社トミー精工) で 15 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4°C) し、タンパク質を除去する。得られる上清を 5 M 水酸化カリウムにて pH 2.2 に調整し、塩を含んだまま 4 mL に定容・静置冷却の後、再び高速微量冷却遠心機 MR-150 で 10 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4°C) して塩を除去した上清を 0.45 μm のメンブランフィルターにて濾過し、このうち 200 μl を HPLC 分析 (HPLC 分析条件 D) に供する。

2-3. HPLC による B₆ ビタマーの分析法

各 B₆ ビタマー標準溶液 (500nM) について 2, 4, 6, 8 倍に希釈し、無希釈のものと合わせて 5 濃度の HPLC 分析用希釈標準溶液とする。PLP 以外のそれぞれのビタミン B₆ 分析用希釈標準溶液 1 mL について 0.1 M 塩酸でそれぞれのサンプルの分析条件の pH (3.5 または 5.5) に調整し、ミリ Q 水で 2 mL に定容する。次いで 0.45 μm のメンブランフィルターにて濾過した後 200 μl を HPLC 分析に供する。PLP 分析用希釈標準溶液の場合は、そのまま後述する KCN 処理に供した後、200 μl を HPLC 分析に供する。試料により多少分析条件が異なるので、以下にその詳細を示す。HPLC 分析条件 A (ラット血漿 PCA 抽出液 B₆ ビタマーの分析法)

HPLC 分析装置は以下に示すとおりである。システムコントローラー: TOSOH スーパーシステムコントローラー SC-8020, オートサンプラー: TOSOH オートサンプラー AS-8020, 送液ポンプ: TOSOH マルチポンプ CCPM-II, 恒温槽: TOSOH カラムオープン CO-8020, 脱気装置: TOSOH オンラインデガッサ SD-8022, カラム: TOSOH TSKgel ODS-120A (4.6 mmID × 25 cm), 検出器: TOSOH 蛍光検出器 FS-8020, プリンタ: CANON バルブジェットプリンタ BJ-15V. また、HPLC 分析条件は以下に示すとおりである。検出波長: 励起波長 305 nm, 蛍光波長 390 nm, 流速: 0.5 mL/min, 圧力: 約 46 kg/cm², 温度: 30°C, 移動相: CH₃CN/0.1 M KH₂PO₄-0.1 M NaClO₄ (pH 3.5) =1:99 (v/v)。

ラット血漿 B₆ ビタマーの分析例を図 1 に、ヒト血漿 B₆ ビタマーの分析例を図 2 に示す。

HPLC 分析条件 B (ラット血漿 PCA 抽出液 PLP の分析法: KCN 処理法)

HPLC 分析装置は HPLC 分析条件 A と同じである。HPLC 分析条件は、検出波長: 励起波長 320 nm, 蛍光波長 420 nm であること以外は HPLC 分析条件 A と同じである。ラット血漿 PLP の分析例を図 3 に示す。

HPLC 分析条件 C (ヒト血漿 PCA 抽出液 PLP の分析法: KCN 処理法)

HPLC 分析装置は HPLC 分析条件 A と同じである。HPLC 分析条件は、検出波長: 励起波長 320 nm, 蛍光波長 420 nm, 移動相の pH が 5.5 であること以外は HPLC 分析条件 A と同じである。ヒト血漿 PLP の分析例を図 4 に示す。

HPLC 分析条件 C (ラット尿 PCA 抽出液中 PIC の分析法)

HPLC 分析装置は HPLC 分析条件 A と同じである。HPLC 分析条件は、検出波長: 励起波長 355 nm, 蛍光波長 436 nm, 流速: 1.0 mL/min, 圧力: 約 140 kg/cm², 温度: 30°C, 移動相: 1.96 mM H₃PO₄ (pH 2.2) /CH₃OH = 9:1 (v/v)

(適当量のミリ Q 水に 85%リン酸 2.3 mL を添加し、5 M 水酸化カリウムで pH 2.2 に調整する。これを 900 mL とし、0.45 μm のメンブランフィルターにて濾過した後、HPLC 用メタノール 100 mL を加える) である。ラット尿中 PIC の分析例を図 5 に示す。

C. 健康危機情報

特記する情報なし

D. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

F. 引用文献

なし

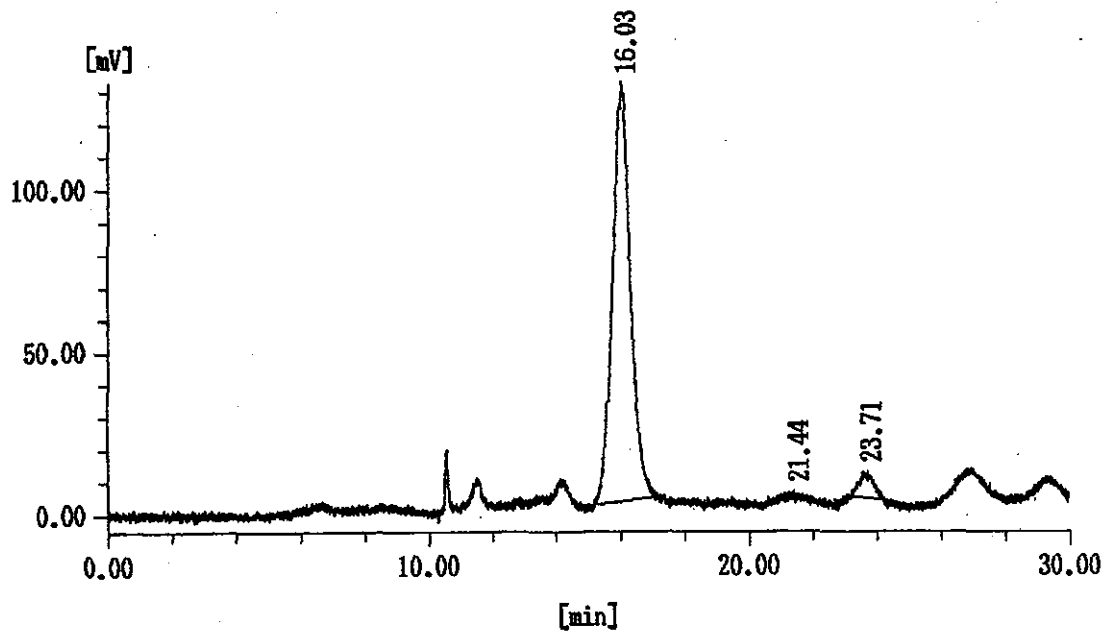


図1. ラット血漿中 B₆ ビタミンの HPLC 分析クロマトグラム の例

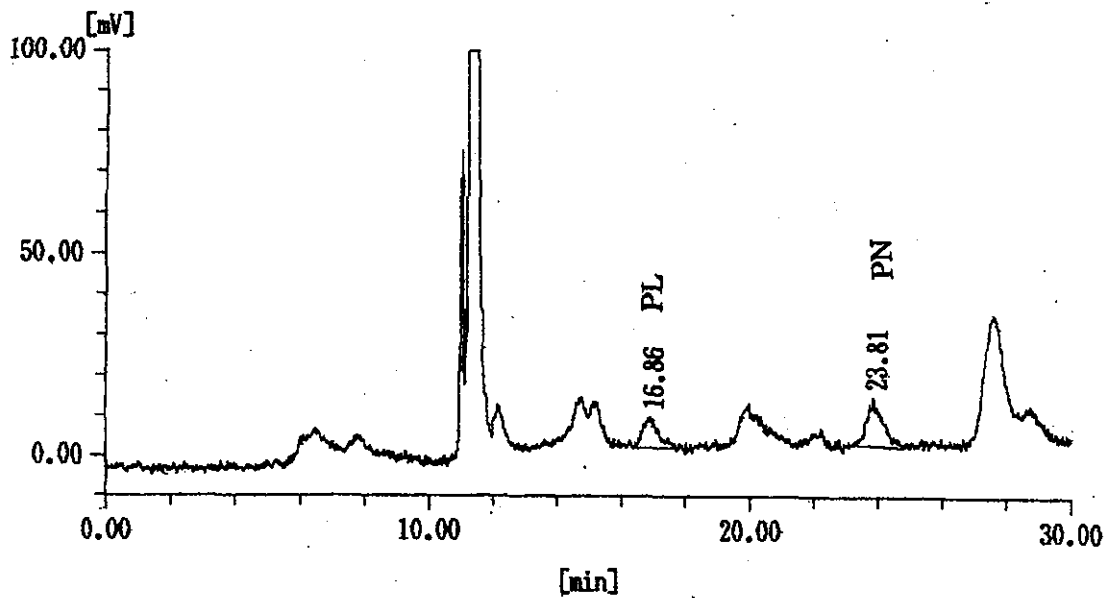


図2. ヒト血漿中 B₆ ビタミンの HPLC 分析クロマトグラム の例

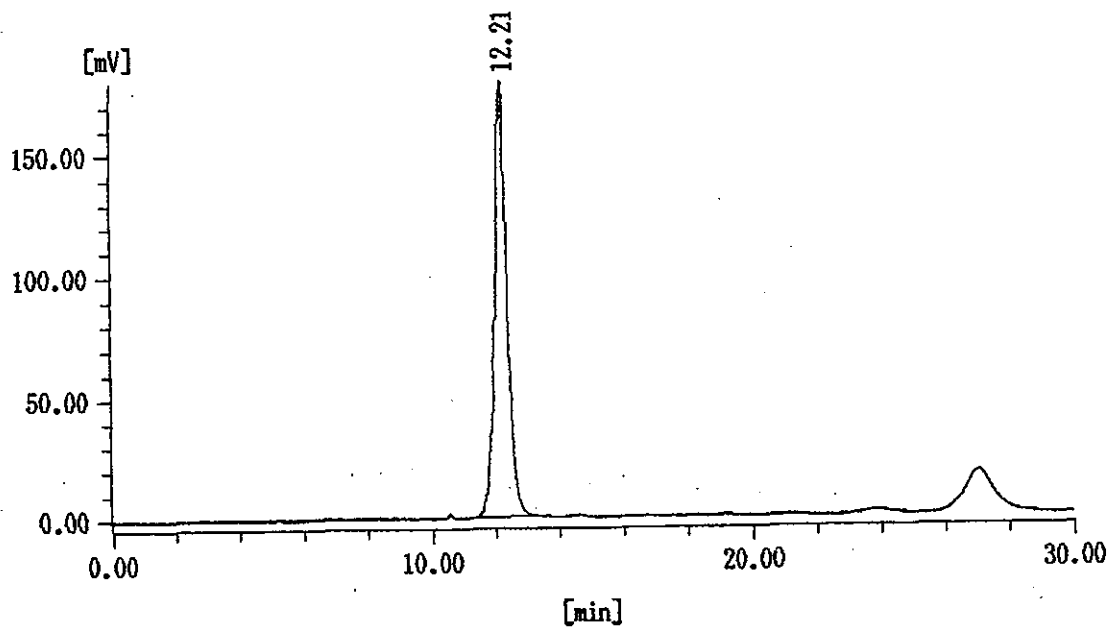


図 3. ラット血漿中 PLP (PIC-P) の HPLC 分析クロマトグラム の例

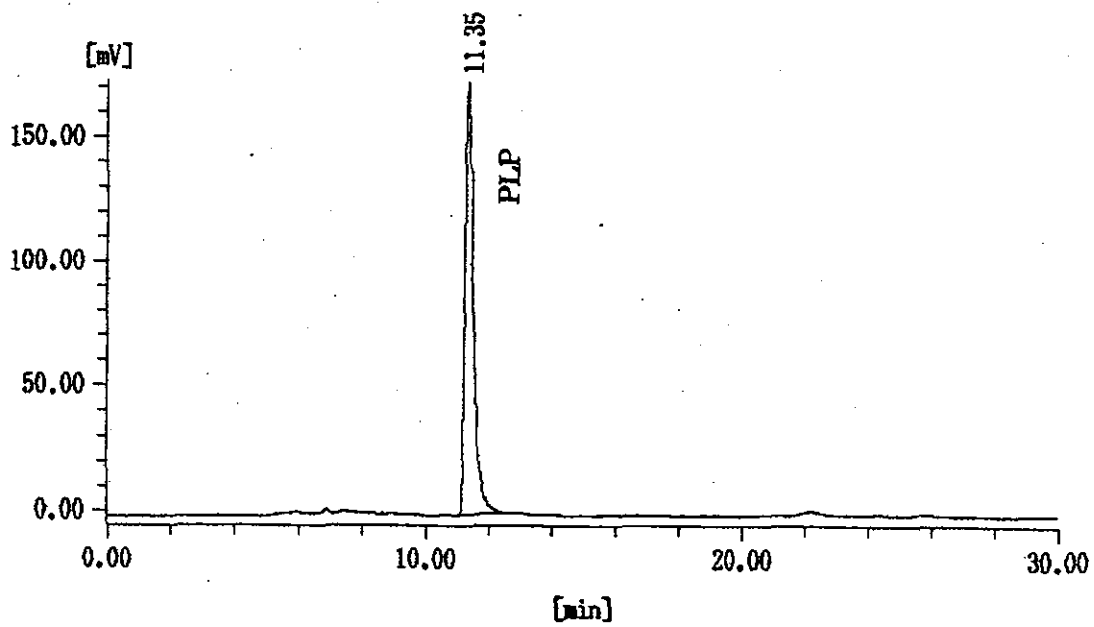


図 4. ヒト血漿中 PLP (PIC-P) の HPLC 分析クロマトグラム の例

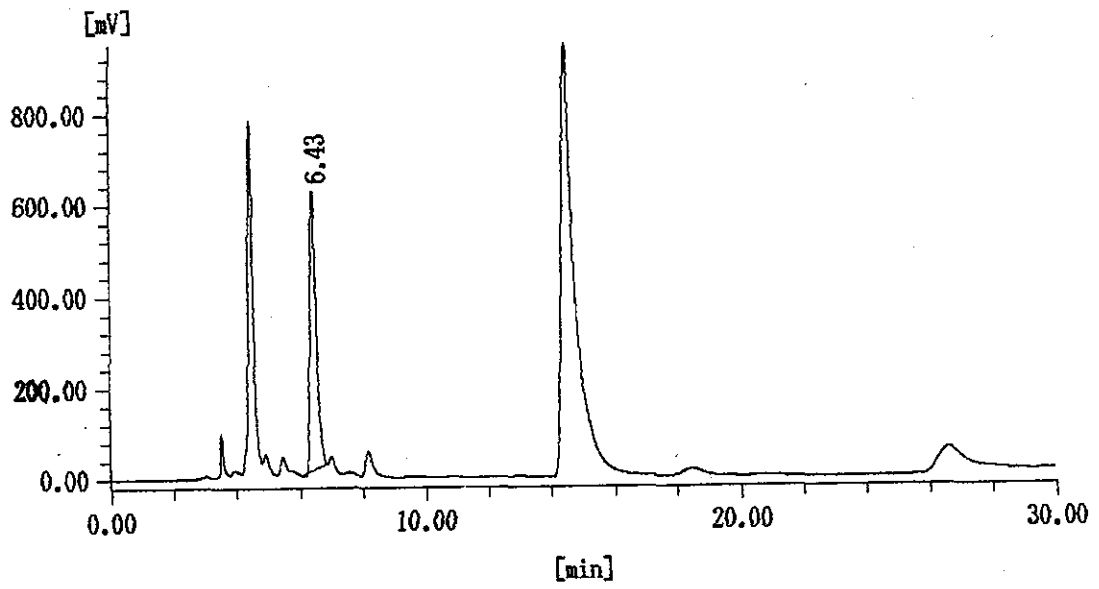


図5. ラット尿中PICのHPLC分析クロマトグラム例

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

3. 高たんぱく質食摂取下における若齢および成熟ラットのビタミン B₆ 栄養について

分担研究者 早川 享志 岐阜大学 教授

研究要旨

ビタミン B₆ は、6-11 か月の乳幼児では 0-5 か月の乳幼児の AI と成人の食事摂取基準からの外挿値の平均値として求めているが、両者は大きく異なっている。また、ビタミン B₆ の所要量は、たんぱく質あたりのビタミン B₆ 必要量をもとに計算されることになったが、一般に成長期では成熟期よりもたんぱく質の必要量が高い。また、成熟期に比べて成長期においては、たんぱく質も異化よりも同化による利用が大きくなり、成長期におけるたんぱく質摂取量あたりで算定したビタミン B₆ 食事摂取基準は、成熟期よりも高く見積もられる可能性がある。そこで、本研究においては、4 週齢の若齢ラットと 16 週齢の成熟ラットをそれぞれ成長期と成熟期と考え、それらのラットに高たんぱく食を摂取させた場合のビタミン B₆ 栄養状態について評価することにより、成長期におけるビタミン B₆ 食事摂取基準の妥当性について検討した。その結果、高たんぱく食（たんぱく質摂取量あたりのビタミン B₆ 摂取量は同じである）を摂取した場合、ビタミン B₆ 栄養状態の指標である血漿のビタミン B₆ レベルは、有意差な差はなかったが、若齢ラットの方が高値であった。また、クレアチニン当たりの 4-ピリドキシン酸排泄量は、若齢ラットの方が高い傾向があった。従って、たんぱく質必要量の高い成長期においては、たんぱく質摂取量あたりで算定したビタミン B₆ 食事摂取基準は、高めに算定されている可能性があると考えられた。

A. 目的

ビタミンB₆の食事摂取基準は、6-11ヶ月乳幼児では、0-5ヶ月乳幼児からの外挿値と大人からの外挿値の平均値として求められているが、両者の値は隔たっている。このようにビタミンB₆の食事摂取基準はまだ曖昧な部分が残されている。ビタミンB₆の食事摂取基準は、たんぱく質摂取量あたりで策定されているが、たんぱく質の代謝を考えると同化による利用は、成長期に盛んであるのに対して、大人では成長期と比較して異化代謝に利用される割合が高いと考えられる。ビタミンB₆の必要量は、たんぱく質摂取量が増すと増加する¹⁾ことがたんぱく質摂取量あたりでビタミンB₆の食事摂取基準を策定する根拠をサポートしているが、成長期と成熟期でのたんぱく質代謝の違いがビタミンB₆の食事摂取基準にも影響を及ぼす可能性が考えられる。すなわち同じたんぱく質摂取レベルにおいて必要とされるビタミンB₆必要量に違いがある可能性が考えられる。

ビタミンB₆の栄養評価は、中長期的には血漿のビタミンB₆レベルにより判定される²⁾。一方、過剰なビタミンB₆は尿中に排泄され、一部は4-ピリドキシン酸として排泄される³⁾。従って、体内ビタミンB₆栄養指標として血漿のビタミンB₆レベルを、ビタミンB₆の代謝指標として尿中ビタミンB₆関連物質排泄量を測定することによりビタミンB₆栄養状態の比較が可能ではないかと考え、週齢の異なるラットにおいて高たんぱく質摂取時のビタミンB₆栄養について調べることにより成長期と成熟期でのたんぱく質代謝状態の違いがビタミンB₆栄養に及ぼす影響について検討することとした。

B. 実験方法

1. 動物実験法

実験動物は4週齢(体重80~100g)および15週齢(体重360~380g)のWistar/ST系Clean雄ラットを日本エスエルシー株式会社より購入した。15週齢のラットは16週齢(平均体重382±3g)までポリカーボネート製のケージで飼育(飼料:オリエンタル酵母工業株式会社製MF食)後、実験に使用した。

予備飼育にはAIN-76TM標準飼料を用い、本

飼育では表1に示した飼料組成に従いカゼイン含量を60%に調製した飼料を用いた。飼料成分であるカゼイン、AIN-76TMミネラル混合、セルロースパウダーはオリエンタル酵母工業株式会社より、重酒石酸コリンは和光純薬工業株式会社より、Retinol acetateはSigma社より、その他はすべてナカライテスク株式会社より購入した。

ラットは5連の個別ケージに入れ、実験環境に慣らすためにAIN-76TM標準飼料で3日間予備飼育した。予備飼育後、4週齢のラットを若齢群、16週齢のラットを成熟群とし、各群7匹からなる2群を設けた。各群に実験飼料を与え、26日間飼育した。飼育期間中、飲料水(水道水)、実験飼料は自由摂取とし、毎日体重と飼料摂取量を測定した。飼育室の温度は23±1℃に設定し、明暗12時間サイクル(6:00~18:00)とした。また、飼育開始4週目に24時間尿および24時間糞を採取し、分析まで-20℃で保存した。尿については尿量、クレアチニン量および4-ピリドキシン酸量を、糞については凍結乾燥後、重量を測定しMILLSER (FOODS MILL, Iwatani)で粉碎後、総ビタミンB₆含量測定に供した。

本飼育開始から27日目にエーテル麻酔下で解剖を行った。採血は1%ヘパリンNa処理したシリンジと注射針を用い、開腹後、腹部大動脈より行った。採取した血液は15分間遠心分離(1,500×g, 4℃)し、血漿サンプルを得た。また、摘出した肝臓は重量を測定後、血漿サンプルとともに分析まで-20℃で凍結保存した。

2. 血漿および肝臓中B₆ピタマーおよび尿中ピリドキシン酸の分析

血漿および肝臓中のB₆ピタマーは柘植らの方法⁴⁾に従いHPLCにより分析した。PLPについては、抽出液をシアン化カリウム(KCN)処理により4-ピリドキシン酸5'-リン酸(PIC-P)に変換後高感度で分析する柘植の方法⁵⁾を用いた。尿中の4-ピリドキシン酸(PIC)は、GregoryとKirkの方法³⁾により分析した。

3. 微生物定量法による尿中および糞中総ビタミンB₆量の測定

4週目に回収した尿は、1500×g, 4℃で10分間遠心分離しその上清を-20℃で保存した。この尿サンプルは0.055 M HCl下

121°Cで4時間オートクレーブすることにより加水分解処理を行い pH 5.0 に調整したものを *Saccharomyces cerevisiae* 4228 (ATCC 9080) を使用した微生物定量法に供した⁶⁾。粉碎糞についても 0.055 M 塩酸下 121°Cで5時間オートクレーブを行いビタミンB₆を抽出後、pH5.0 に調整し尿と同様に微生物定量法に供した。

4. その他の分析法

尿中クレアチニンは、Wchstein & Gudaitis の方法⁷⁾により分析した。

5. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差 (SE) であらわし、Student の t-test により危険率5%にて有意性を判定した。

C. 結果

実験期間中の最終体重、体重増加量、総飼料摂取量、飼料効率を表2に示した。最終体重、総飼料摂取量は成熟群に比べ若齢群で有意に低値となった。体重増加量は若齢群で有意に高く、成熟群においては成長増加の鈍化が確認された。

血漿 PL および PLP 濃度を図1(A)および1(B)に示した。有意な差ではなかったが、成熟群よりも若齢群で高値となった。一方、肝臓 PLP および PMP 含量を図2(A)および2(B)に示した。PMP および PLP 含量は何れも、有意差はなかったが、成熟群で高値を示した。また、両群で PMP が PLP よりも高値を示した。

クレアチニン当たりの尿中 PIC 排泄量を図3に示した。クレアチニン当たりでは、尿中 PIC は若齢群で高い傾向であった。体重 100 g、1日当たりの尿総 B₆ 排泄量および糞総 B₆ 排泄量を図4に示した。体重 100 g、1日当たりの尿総 B₆ 排泄量および糞総 B₆ 排泄量は有意な差は認められなかった。

D. 考察

ビタミン B₆ の食事摂取基準は、たんぱく質摂取量当たりで算定されている⁸⁾。今回用いた飼料は、カゼイン含量が60%と高いことから、ビタミン B₆ 栄養の立場からは厳しい飼料条件である。というのは、ビタミン B₆ の要求性は、摂取するたんぱく質の量に依存している⁹⁾ ことから、この飼料条件では、ビタミン B₆ 要求量自体が増加してい

ると考えられるからである。今回の実験においては、有意差は見られなかったが、血漿の PLP も PL も若齢群の方が高値であった。これとは対照的に肝臓においては有意差はないものの、成熟群の PLP および PMP 含量が若齢群よりも高値を示した。ビタミン B₆ は、PLP や PMP 補酵素としてアミノ酸代謝に関わっているため、成熟群での肝臓ビタミン B₆ レベルの増加は、この群におけるたんぱく質異化に関わるビタミン B₆ は動員が盛んになっている状況を示唆していると考えられる。今回の実験においては、ラット自体の大きさに違いがあるため、尿への PIC 排泄量は、クレアチニン当たりで表した。若齢群では、クレアチニン当たりの1日尿中 PIC 排泄量は高い傾向にあった。図には示していないが 100 g 体重当たりの場合も同様な傾向であった。尿中への総ビタミン B₆ 排泄量は 100 g 体重当たりの1日量として求めた。若齢群で数値が高かったが、有意な差は見られなかった。一方、100 g 体重当たりの1日量としての糞中の総ビタミン B₆ 排泄量も同様に若齢群で高めであったが、有意な差はなかった。糞 1 g 当たりの総ビタミン B₆ 含量は両群ともほぼ同じであった。通常の飼料の場合には、糞ビタミン B₆ 含量は腸内細菌がこのビタミンを産生しない限り変わらない結果が得られていることから¹⁰⁾、飼料由来のビタミン B₆ は、問題なく吸収されていると考えてよい。

以上のように、若齢群での血漿 PLP および PL レベル、クレアチニン当たりの尿中 PIC 排泄量、100 g 体重当たりの尿中総ビタミン B₆ 排泄量の全てが対照群よりも高い傾向にある結果から、若齢群の B₆ 必要量は成熟群よりも少ない可能性があり、今後もこの点を中心に検討を勧めたいと考えている。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献

1. Okada M, Shibuya M, Akazawa T, Muya H, Murakami Y (1997) Dietary protein as a factor affecting vitamin B₆ requirement. *J Nutr Sci Vitaminol*, 44,37-45.
2. Lumeng L, Ryan PM, Li T (1978) Validation of the diagnostic value of plasma pyridoxal 5'-phosphate measurements in vitamin B₆ nutrition of the rat. *J Nutr*, 108, 545-553.
3. Gregory FJ, Kirk RJ (1979) Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*, 32, 879-883.
4. Tsuge H, Oda T, Miyata H (1986) Separation and determination of vitamin B₆ derivatives by reversed-phase HPLC. *Agric Biol Chem*, 50, 195-197.
5. Tsuge H, Toukairin-Oda T, Shoji T, Sakamoto E, Mori M, Suda H (1988) Fluorescence enhancement of PLP for application to HPLC. *Agric Boil Chem*, 52, 1083-1086.
6. 柘植治人, 早川享志: 第4章水溶性ビタミン4.5 ビタミンB₆(分担) “新・食品分析法” 日本食品科学工学会食品分析法編集委員会編, 光琳 394-406, 1996.
7. Wachstein M, Gudaitis A (1953) Disturbance of vitamin B₆ metabolism in pregnancy. (II) The influence of various amounts of pyridoxine-hydrochloride upon the abnormal tryptophan-load test. *J Lab Clin Med*, 42, 98-107.
8. Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press.
9. Hansen CM, Leklem JE, Miller LT (1996) Vitamin B-6 status of women with a constant intake of vitamin B-6 changes with three levels of dietary protein. *J Nutr*, 126, 1891-1901.
10. Hayakawa T, Iida Y, Tsuge H: (1999) Konjac mannan improves the vitamin B-6 status of rats fed a vitamin B-6-deficient diet. *Internat J Vit Nutr Res*, 69, 106-112.

表1. AIN-76TM標準飼料および実験飼料

Ingredients	AIN-76 TM diet	Experimental diet
	(%)	(%)
Casein	20.0	-
Vitamin-free casein	-	60.0
Soybean oil	5.0	5.0
Sucrose	50.0	12.4
Cellulose powder	5.0	2.0
AIN-76 TM vitamin mixture	1.0	1.0
AIN-76 TM mineral mixture	3.5	3.5
DL-Methionine	0.3	0.9
Choline bitartrate	0.2	0.2
α -Cornstarch	15.0	15.0

表2. 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量および飼料効率

	若齢群	成熟群
Final body weight (g)	306 \pm 6	442 \pm 10*
Body weight gain (g)	182 \pm 6	59 \pm 7*
Total food intake (g)	434 \pm 13	485 \pm 14*
Feed efficiency	0.421 \pm 0.008	0.119 \pm 0.012*

Values are means \pm SE (n=7).

* Significantly different from the Young group at $P < 0.05$.

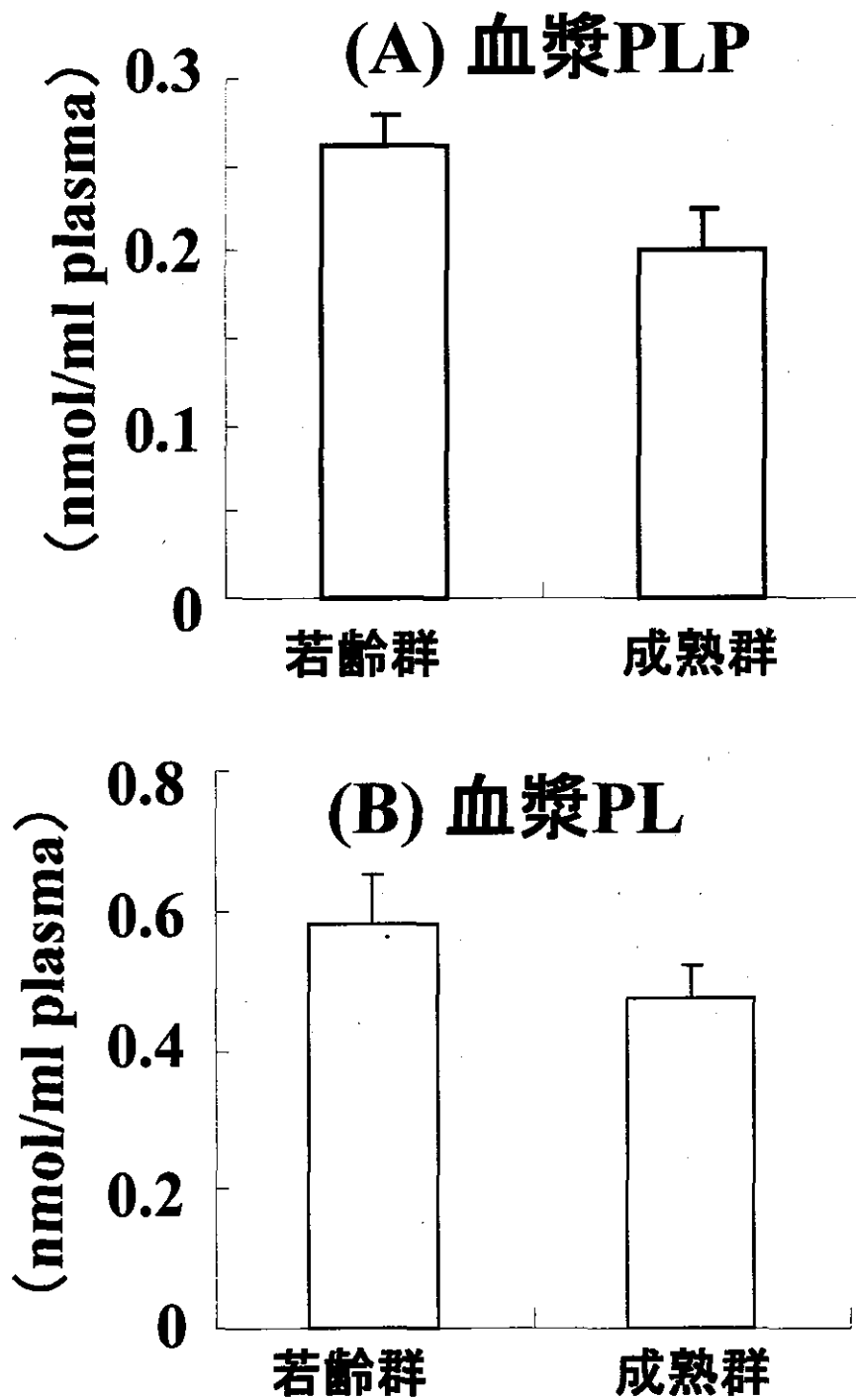


図1. ラット血漿中PLP(A)およびPL(B)濃度

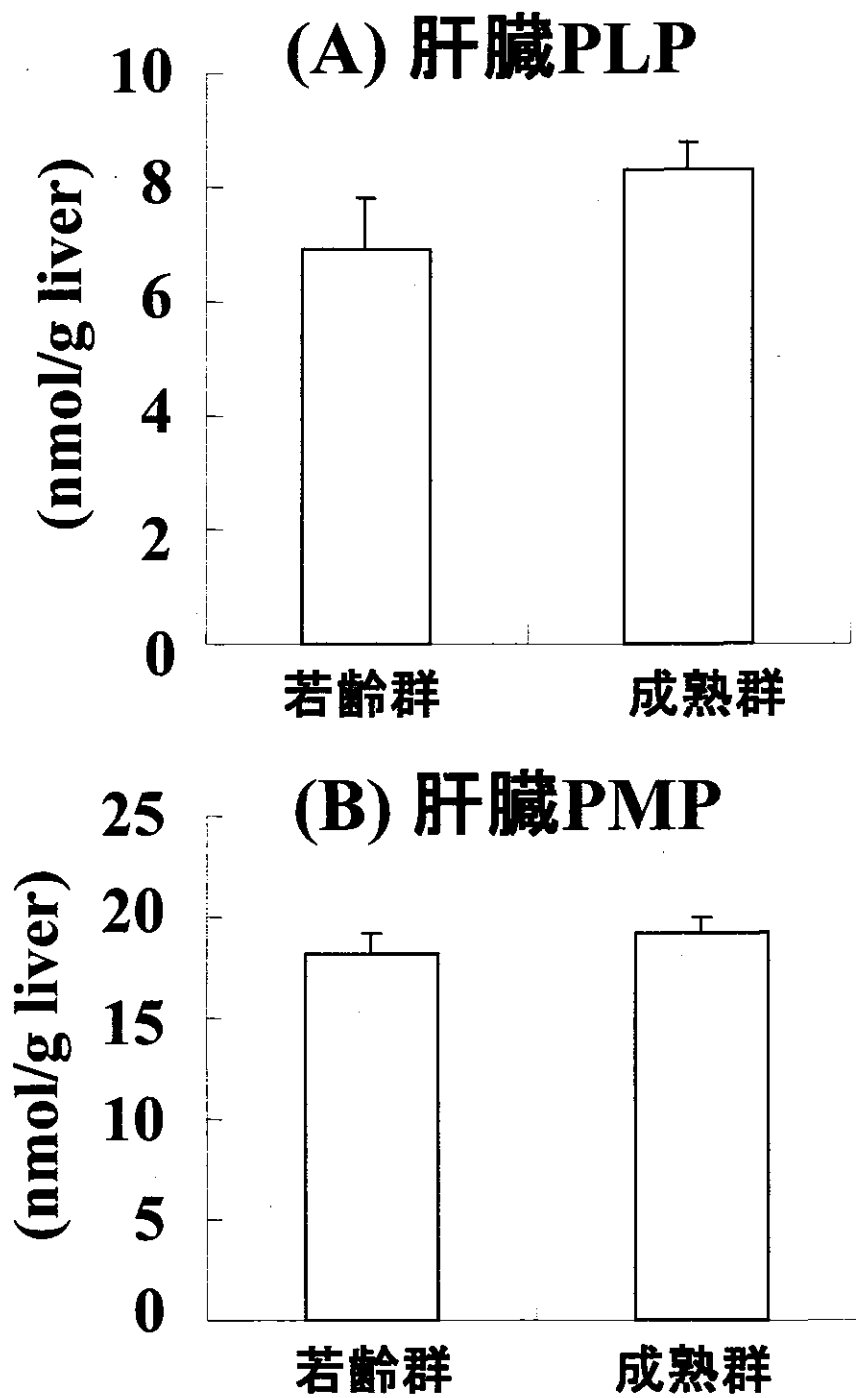


図2. ラット肝臓中 PLP(A)および PMP(B)含量

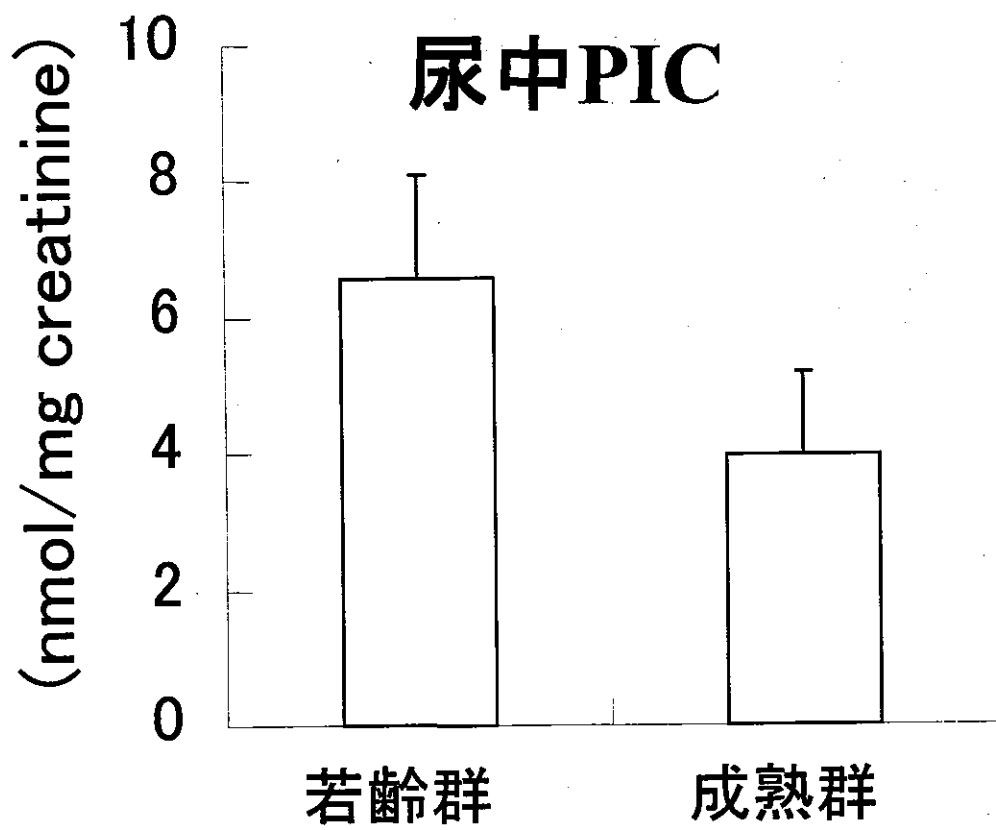


図3. ラット尿中PIC排泄量

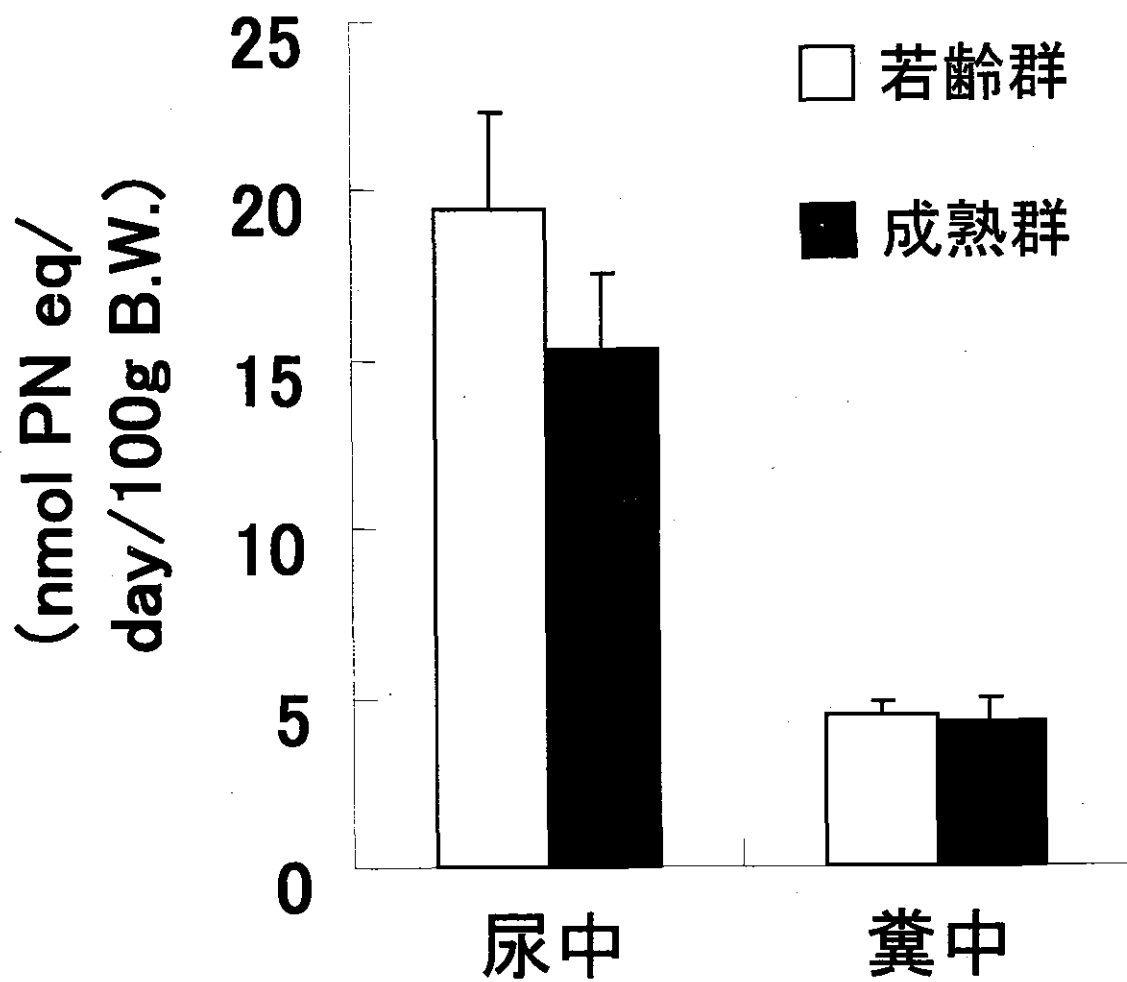


図4. ラット尿中および糞中総ビタミンB₆排泄量

平成16年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

III. 分担研究者の報告書

4. ビタミンB₁₂の栄養評価に関する基礎的研究

分担研究者 渡辺文雄 高知女子大学生生活科学部 教授
研究協力者 宮本恵美 高知女子大学生生活科学部 助手

研究要旨

①食品中のビタミンB₁₂の特性と栄養評価：植物性食品（食用藻類、茶葉、野菜など）や微生物が関与する水産発酵食品（魚醤、めふん）に含まれるコリノイド化合物の特性や栄養価について検討し、B₁₂の食品分析法の改良の必要性を明らかにした。②ビタミンB₁₂栄養状態の新規な指標の検討：B₁₂の栄養状態を特異的に且つ感度よく示す指標として血球中のB₁₂依存性酵素（メチオニン合成酵素とメチルマロニルCoA ムターゼ）活性が利用できるかどうかを検討した。③食品タンパク質結合ビタミンB₁₂吸収障害への対策法の検討：人工消化系を用いて胃酸の有無がB₁₂の消化に及ぼす影響について検討した結果、胃酸の低下により顕著に食品からのB₁₂の遊離が減少した。急速な高齢化を迎えるわが国において食品タンパク質結合性B₁₂吸収不全症への予防・対応策として日常の食生活で利用しやすいB₁₂強化食品の開発を検討した。

I. 食品中のビタミンB₁₂の特性と栄養評価

ビタミン B₁₂(B₁₂)は真紅の水溶性化合物であり、テトラピロール様構造を有するコリン環の中心にコバルト原子が結合したユニークな構造をしている(図-1)。B₁₂は細菌などの微生物で生合成され、植物にはB₁₂生合成能がないことが知られている^{1,2)}。細菌などで生合成されたB₁₂は食物連鎖により動物の各組織に蓄積されるため、動物性食品がB₁₂の主要な供給源であるが、食用藻類の中にB₁₂をかなり多量に含むものがある。五訂日本食品標準成分表によると乾燥アオノリ(31.8μg/100g)、乾燥アマノリ(7.6μg/100g)のB₁₂含量は、牛肝臓(52.8μg/100g)に匹敵する³⁾。また、栄養補助食品として流通している微細藻類のクロレラやスピルリナの乾燥錠剤にも多量のB₁₂が含まれていることが各社製品の成分表に記載されている。食用藻類(微細藻類を含む)に含まれるB₁₂の栄養価については、否定的な報告もあり^{4,5)}、定まっていない。また、我が国のマスメディアにおいて食用藻類以外の一部の動物性食品についてもB₁₂が豊富に含まれているとしばしば報道されるが、その科学的根拠は不十分である。そこで我々は植物性食品のB₁₂の特性や栄養価について検討したので、以下その概要をまとめた。

1) 食用藻類(微細藻類を含む)

市販されている数種類の食用藻類のB₁₂含量を五訂日本食品標準成分表に準じた微生物学的定量法⁶⁾で測定した結果、緑藻のスジアオノリ(四万十ノリ)と紅藻のスサビノリは多量のB₁₂(20-70μg/100g乾燥重量)を含有していた⁷⁾。また、スサビノリ⁸⁾やスジアオノリ⁹⁾の凍結乾燥藻体からコリノイド化合物を単離・同定した結果、真のB₁₂であった(表-1)。また、B₁₂欠乏ラットを用いてスサビノリに含まれるB₁₂のバイオアベイラビリティについて検討した結果、B₁₂欠乏ラットの尿中メチルマロン酸排泄(B₁₂欠乏症の指標)はノリ添加飼料投与後20日目で検出されなくなり、肝臓中のB₁₂含量(特に補酵素型B₁₂)は有意に増加していた¹⁰⁾。以上結果は、スサビノリがB₁₂のよい供給源となることを示唆している。

また、栄養補助食品として市販されているクロレラやスピルリナ錠剤ならびに乾燥ハプト藻に含まれるコリノイド化合物を単離・同定した。ハプト藻¹¹⁾やクロレラ錠剤¹²⁾から単離されたコリノイド化合物は真のB₁₂であったが、スピルリナ錠剤に含まれる主要なコリノイド化合物はシユードB₁₂であり、B₁₂の供給源にはならないことが明らかとなった¹³⁾(図-2)。

現在、スピルリナと異なり真のB₁₂を含んでいるとして市販されている藍藻由来の栄養補助食品A.F.A(*Aphanizomenon flos-aquae*)に含まれるコリノイド化合物を単離・同定を試みている。予備実験の結果(図-3, 図-4)、A.F.Aに含まれているコリノイド化合物はB₁₂でもシユードB₁₂でもなく、未同定のコリノイド化合物である可能性があり、NMR分析を含めた機器分析でその構造を明らかにする予定である。

食用藻類のB₁₂の起源については、植物細胞にはB₁₂の生合成系が存在しないため、藻体に付着しているB₁₂合成細菌に由来すると考えられているが、食用藻類や微細藻類においてB₁₂の取込み系が存在するという報告もある^{14,15)}。また、無菌培養したスサビノリを用いてB₁₂の生合成を示唆する実験結果も報告されている¹⁶⁾。一般的にスピルリナのような藍藻はコリノイド化合物(B₁₂を含む)の生合成能を有している¹⁷⁾。

2) 茶葉(茶葉抽出液)

種々の乾燥茶葉のB₁₂含量を五訂日本食品標準成分表に準じた微生物学的定量法を用いて測定したところ、すべての茶葉にB₁₂が含まれていた[100gあたりのB₁₂含量(アルカリ耐性因子を補正):緑茶(125-535ng)、青茶(525-528ng)、紅茶(663ng)、黒茶(493-1190ng)]¹⁸⁾。特に、黒茶の中で六堡茶とバタバタ茶にB₁₂含量が高かった。製造工程で微生物の関与するバタバタ茶には100g乾燥茶葉あたり0.4μg(100mL茶抽出物あたり2.0ng)のB₁₂が含まれていた。そこで乾燥バタバタ茶葉に含まれるコリノイド化合物を単離・同定した結果、真のB₁₂であった¹⁹⁾。B₁₂欠乏ラットを用いてバタバタ茶(抽出物)に含まれるB₁₂のバイオアベイラビリティについて検討した結果、B₁₂欠乏ラットの尿中メチルマロン酸排泄はバタバタ茶(1ng/日;50mL)投与後14日目で顕著に減少し、肝臓中のB₁₂含量は有意に増加していた¹⁹⁾。以上の結果は、バタバタ茶に含まれるB₁₂が生理的に有効であることを示唆している。また、最近の研究から緑茶においても同様な結果を得ている²⁰⁾。

日常的に摂取しているお茶(茶葉抽出物)の中に生理的に有効なB₁₂が含まれており、少なからず我々の健康維持・増進に貢献していることが示唆された。世界的にB₁₂欠乏症が広がりを見せている中²¹⁾本研究成果は、米国において特に注目されている²²⁾。

3) タケノコおよびその他の植物性食品

我が国のマスメディアにおいてタケノコの栄養価に関する報道の中で「タケノコは植物性食品としては珍しくB₁₂を豊富に含む」ことがしばしば