

## A. 研究目的

食事からのビタミン摂取量と体内レベルを把握することは食事摂取基準策定において重要である。そのためには食品ならびに生体試料のビタミンが迅速かつ適切に分析できる方法・条件の設定、ビタミンの生体内レベルを適切に評価できる生体指標の選定が要求される。葉酸は核酸とアミノ酸の一炭素転位の補酵素としての働きを持つため、葉酸が慢性的に著しく欠乏すると赤血球に分化するのに必要な DNA が不足し、巨赤芽球性貧血を引き起こすことが知られている。また、葉酸欠乏によりホモシステインがメチオニンに再メチル化されず、体内のホモシステインレベルが上昇する。ホモシステインは心血管疾患、脳血管疾患などのリスクファクターであるため、これらの疾患に対する葉酸投与効果が注目されている。葉酸は Folic acid(図 1) と Folate の 2 つに分類され、Folic acid は PteGlu<sub>1</sub> (Pteroylmonoglutamic Acid) を指し、Folate は Folic acid に類似した化学構造と栄養活性を持つ化合物の総称で、一般には天然の食品中に存在するものを指している。葉酸には様々な誘導体が存在するため一つの化学物質として個別に測定することは難しい。例えば、食品中の葉酸含量の測定法として ELISA 法があるが、その方法では限られた誘導体しか測定できない。そのため、食品中および生体内の葉酸測定法として、生育に葉酸を必要とする乳酸菌を用いた微生物学的測定法があり、その方法では多種類の葉酸が測定可能である。

食品中の葉酸の生体利用率は Folic acid に比べて低いことが示されている。通常の栄養実験で利用されるラットやマウスとヒトでは葉酸の代謝が異なることも示唆されているが、多く食品中の葉酸の生体利用率をヒト

において評価する事は現実的には困難である。そのため実験動物を用い、ある程度の葉酸の生体利用率の評価が行える条件を設定し、その基礎的検討結果をヒト試験に適用して葉酸の生体利用率を確認することが適切と考えられる。

本研究では多種類の葉酸が測定できるクロラムフェニコール耐性 *Lactobacillus rhamnosus* を用いた微生物学的測定法の設定を行い、次にラットを利用した食事の中の葉酸を評価するための基礎的検討を行った。次にその条件を応用して日本人が摂取している葉酸の供給源として大きな割合を占めている緑茶葉酸<sup>1)</sup>の生体利用率を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 葉酸の分析方法に関する検討

#### 1-1 保存用菌体培養方法<sup>2)</sup>

*Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 27773)の凍結乾燥菌体に菌体保存培地(葉酸定量用培地 9.4g、水 200mL、1mg/mL クロラムフェニコール 4mL、250mg/mL アスコルビン酸 400μL、葉酸 120ng)を 1 mL 加えて再水和し、これを菌体保存培地 5mL に移し、37°Cで 42 時間培養した。この培養液 10μL をとり、新しい菌体保存培地(5mL)に入れて 37°Cで 24 時間培養した。同様の操作をさらに 2 回行ない、生育のよい菌体を調製し、最終的にグリセロール溶液として分注して-80°Cにて凍結保存した。

#### 1-2 葉酸の微生物学的測定方法

##### 1)葉酸標準液の調製

Folinic acid calcium salt pentahydrate を 20mg 前後秤量し、25mL にメスアップした。ここから 400μL とり、0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で 50mL に希釈し、285nm で吸光度

を測定して分子吸光係数 ( $37.2 \times 10^3$ ) より、標準液の濃度を算出した。この標準液は S 体と R 体の両方を含むラセミ体であり、菌体は S 体のみを利用するのでこの半分の濃度を標準液の濃度とした。

## 2) 葉酸の測定方法<sup>3)</sup>

葉酸定量用培地 4.7g に蒸留水 100mL を加えて加熱溶解し、冷却後に滅菌フィルター処理したクロラムフェニコール(1mg/mL)溶液 3mL を加えて使用培地とした。この使用培地に滅菌フィルター処理アスコルビン酸溶液 (250mg/mL) 300 $\mu$ L、凍結保存しておいた菌体のグリセロール懸濁液を 200 $\mu$ L それぞれ加え、培地・菌体混液を調製した。96-well マイクロプレート(Nunc 社製)に標準液または試料を 100 $\mu$ L 分注し、次に各 well に培地・菌体混液を 200 $\mu$ L ずつ分注した。プレートにプレートシール(住友ベークライト社製)を貼り、37°C で 42 時間培養し、570nm にて吸光度を測定した。

## 2. 体内葉酸レベルの評価方法についての基礎的検討と生体利用率の評価系設定

### 2-1 実験動物

#### 1) 実験 1 (短時間の葉酸摂取の影響評価に関する検討)

日本 SLC (静岡)から購入した Wistar 系雄ラット (7 週齢)を栄研 6 連ステンレスケージにいれ、常温 (23 $\pm$ 1°C)、12 時間明暗サイクル (明期: 7:00-19:00)の動物室内で飼育した。ラットは市販固形試料 CE-2 (日本クレア(株))を自由摂取させた。ラットには 0.1M 重炭酸ナトリウムに溶解した葉酸 0.33mg/kg 体重 (0.1mg/0.4mL/300g 体重)をゾンデを用いて胃内投与した。対照群には同量の 0.1M 重炭酸ナトリウムを投与した。投与開始直前 (0 時間)、投与 0.5、1、2、3、4、6、8 時間後にラ

ットの尾より予め Heparin を入れておいたマイクロチューブに血液を採取した。なお、全てのラットは投与開始から絶食させた。採取した血液の一部はヘマトクリット管に採取し、ヘマトクリット値の算出に利用した。また、全血と遠心分離 (1,500  $\times$ g で 15min 遠心)により得た血漿をそれぞれ 0.5%アスコルビン酸溶液で 10 倍に希釈し、葉酸測定用の試料とした。

#### 2) 実験 2 (数日間の葉酸摂取の影響評価に関する検討 1)

日本 SLC (静岡)から購入した Wistar 系雄ラット (7 週齢)を実験 1 と同様に市販固形試料 CE-2 (日本クレア(株))で飼育し、また実験 1 と同量の葉酸を 7 日間胃内投与した。投与開始の 3 日前および投与直前 (0 日)、投与 1、3、5、7 日後に実験 1 と同様の方法で採血した。なお、投与期間中の採血は、各投与直前に行った。ヘマトクリット値の算出、葉酸測定用の全血ならびに血漿の試料は実験 1 と同様の方法で調製した。

#### 3) 実験 3 (数日間の葉酸摂取の影響評価に関する検討 2)

日本 SLC (静岡)から購入した Wistar 系雄ラット (7 週齢)に AIN-93G<sup>4)</sup> 組成を基本に調製した低葉酸食(葉酸無添加)、もしくは基本食(葉酸 2mg/kg 飼料)を 3 週間自由摂取させた(表 1)。飼料の組成は表 2 に示した。実験 2 と同様の方法で葉酸 0.33mg/kg 体重 (0.1mg/0.4mL/300g 体重)を 7 日間連続投与した。採血および葉酸測定用の試料の処理は実験 1 と同様の方法で行った。

### 2-2 分析方法

#### 1) 葉酸濃度の測定<sup>5)</sup>

血漿は 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で適宜希釈した。全血はポリグルタミン酸鎖を切断するため 37°C、30 分インキュベートし、その後 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で適宜希釈した。臓器は 9 倍量の 50mM リン酸緩衝液 (pH6.1、0.5%アスコルビン酸)を加えてホモジナイズした後、オートクレーブで 121°C、30 分間加熱し、葉酸を抽出し、すぐに氷冷した後、2500×g、15min、4°C で遠心分離した。その上清 150μL にラット血清由来のコンジュガーゼ 100μL、50mM リン酸緩衝液 (pH6.1、0.5%アスコルビン酸) 2.79mL を加え遮光下で 37°C、6 時間インキュベートし、葉酸測定試料とした。なお、ラット血清由来のコンジュガーゼは、活性炭処理して混在する葉酸を除去して利用した。血液、血球、臓器中の葉酸は微生物学的方法により定量した。

## 2) 血漿ホモシステイン濃度<sup>6)</sup>

血漿 60μL に PBS(pH7.3)30μL と 10%Tris-(2-carboxylethyl)-phosphine 10μL を加えて 37°Cにて 15 分間インキュベートした。10%Trichloroacetic acid(1mM EDTA)90μL 添加し、すぐに 7000×g で 10min 間遠心分離し、得られた上清 40μL に 0.125 M ホウ酸緩衝液 (pH9.5、4mM EDTA) 125μL、1.55M 水酸化ナトリウム 10μL、1mg/mL 7-Fluorobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole-4-Sulfonic Acid ammonium Salt 150μL を加え遮光下で 60°Cにて 60 分インキュベートし、冷却した液を HPLC 用試料とした。HPLC は蛍光検出器を装着し、カラムに Capcell Pack UG120 (3μm、100×4.6mm)、移動相に 0.1M リン酸二水素カリウム (4%メタノール、pH2.7)、流速 1.0mL/min、励起波長 385nm、発光波長 515nm、試料注入量 20μL とした。

## 3. 茶中の葉酸の生体利用率の検討

日本クレア(東京)から購入した Wistar 系雄ラット 4 週齢を用いた。実験 1 に利用した AIN-93G にはビタミンフリーカゼインに葉酸が 0.3μg/g<sup>7)</sup> 以上含まれている。またラットやマウスでは腸内細菌によって合成される葉酸も影響する。そこで遊離アミノ酸から調製し、腸内細菌の増殖を阻止するために Succinyl Sulfathiazole を添加した Dyets 社(PA, USA)製飼料を用いた(表 2)。体内の葉酸レベルを減少させるため、ラットに低葉酸食(葉酸無添加)を 4 週間摂取させた後、①コントロール群 水、②カテキン群 EGCg 29.3mg/kg BW、③葉酸群 Folic acid 116.7μg/kg BW、④葉酸+ カテキン群 Folic acid 116.7μg/kg BW + EGCg 29.3mg/kg BW、⑤緑茶群 208.6mg/kg BW (Folic acid 116.7μg/kg BW、EGCg29.3mg/kg BW 含有)の 5 群に分け、該当するカテキン、茶抽出物、または葉酸をそれぞれ 1 週間胃内投与した。採血および葉酸の測定は 2 と同様の方法で行った。

## C. 結果

### 1. 葉酸の分析方法に関する検討

葉酸標準液を菌体入りの培地で 37°C、42 時間培養して 570nm の吸光度を測定した。葉酸濃度と吸光度の関係を図 2 に示したように 20pM から 400pM の範囲内では葉酸定量に使用できる菌体の生育反応曲線を得ることができた。この結果は文献 3) ともよく一致していた。今回検討した微生物学的定量法による検出は極めて検出感度が高く(検出限界はおおよそ 5pM)、濃い標準液を調製した器具からわずかでも葉酸が混入すると定量曲線が作成できないことから、葉酸定量に使用する器具類等は、葉酸が混入しないように十分注意する必要がある。

## 2. 体内葉酸レベルの評価方法についての基礎的検討

葉酸 0.33mg/kg 体重(0.1mg/0.4mL/300g 体重)を経口投与したラットの血漿葉酸濃度は0.5時間後に投与前の1.5倍に増加し、3時間後に1.6倍と最も高くなり、その後減少し、8時間後には投与前のレベルにもどった。一方、赤血球の葉酸濃度は葉酸投与による有意な変化を示さなかった。

次にラットに葉酸を0.33mg/kg 体重の投与量で7日間連続胃内投与した条件で検討したところ、採血は葉酸投与24時間後に実施しているため、投与1日目と3日目では血漿においても有意な濃度の増加を検出することができなかった。しかし、投与5日目からは有意な増加を検出することができた。一方、赤血球の葉酸濃度は投与7日まで有意な増加を示さなかった。

葉酸を投与しても特に赤血球では、葉酸濃度の増加を検出することができなかった原因として、既に市販固形飼料 CE-2 には十分な葉酸が含まれていることから(2.8mg/kg diet)、赤血球内の葉酸濃度が飽和しており、別途葉酸を投与しても赤血球には取り込まれない可能性が考えられた。そこで、ラットを低葉酸食で飼育し、体内の葉酸濃度を低下させた状態での葉酸投与の影響を検討した。対照には通常の葉酸濃度が含まれる飼料を与えたラットを用いた。低葉酸食を3週間与えることにより葉酸濃度は血漿では著しく低下していたが、赤血球ではそれほど低下しなかった。これらのラットに葉酸を胃内投与したところ、対照とした通常飼料群の血漿葉酸濃度は有意に増加しなかった。しかし、葉酸欠乏食で飼育したラットに葉酸を投与すると血漿葉酸濃度は5日目に1.6倍、7日目

には3.7倍に増加した。一方、赤血球の葉酸濃度はいずれの食餌群においても葉酸投与による大きな変化は見られなかった。葉酸投与の影響を示す他のパラメーターとして、血漿ホモシステイン濃度、肝臓葉酸濃度を測定したところ、血漿ホモシステイン濃度は、欠乏食群では1.9倍に増加したが、葉酸投与により基本食群と同程度に減少した。肝臓葉酸濃度は葉酸欠乏食により、基本食よりも減少し、葉酸投与により基本食群の1/2程度にまで回復した。

## 3. 茶の葉酸の生体利用性についての検討

血漿葉酸濃度は葉酸および葉酸+カテキン投与群では1.3倍に増加したが、緑茶投与群では増加しなかった。肝臓葉酸濃度も葉酸および葉酸+カテキン投与群では2.1~2.2倍に増加したが、緑茶投与群では1.2倍程度しか増加しなかった。骨髄中の葉酸濃度も血漿や肝臓と同様であった。また、血漿ホモシステイン濃度は葉酸および葉酸+カテキン投与群では50~60%程度減少したが、緑茶投与群ではわずか7%しか減少しなかった。

## D. 考察

食品中の葉酸の生体利用率を評価する上で基本となる化合物のFolic acidをラットに投与し、その体内レベルの変化について検討した。通常の市販固形飼料で飼育したラットに葉酸を1回投与、また7日間連続投与したとき葉酸濃度は赤血球では変化しないが、血漿では有意な変化を検出できることが明らかとなった。通常、体内の葉酸濃度が十分に高い条件では葉酸投与の影響を検出することは難しい。そこで低葉酸食を3週間与えて体内の葉酸レベルを減少させた条件で葉酸投与の影響を調べた。そのような実験条件においても血漿葉酸濃度は、葉酸投与によっ

て増加したが、赤血球の葉酸濃度の増加は明確には検出できなかった。以上の結果は特定の食品中の葉酸の消化管からの吸収性を評価する場合には血漿が適していることを示唆した。赤血球の葉酸濃度の変化が検出できない理由には約 120 日間という赤血球の寿命が関連していると考えられた。ヒトを対象とした調査では測定の簡便さから血漿葉酸濃度を体内葉酸レベルの指標として用いることが多いが、食事などの影響により血漿葉酸濃度が変動しやすく長期的な評価には赤血球が適しているとされてきた。今回の実験結果から摂取直後に測定せず、一定時間を空ければ血漿葉酸濃度を中期的な葉酸摂取状態の評価に利用しても問題ないことが示唆された。今回検討した低葉酸食の摂取の条件において、赤血球よりもむしろ肝臓において葉酸投与の影響を明確に検出できた。肝臓は体内で最も葉酸貯蔵量の多い臓器であることを考慮すると、動物を利用した予備的検討において肝臓の葉酸濃度の変化は葉酸摂取の影響を評価する良い指標になりうると考えられた。低葉酸食群の血漿ホモシステイン濃度は葉酸投与によりコントロール食と同程度のレベルにまで回復した。この結果より、体内の葉酸レベルと葉酸投与の影響を調べるマーカーとして血漿ホモシステイン濃度は優れていると考えられる。

今回検討したラットにおける食品中葉酸の生体利用率の評価系で、緑茶中の葉酸の生体利用率を評価したところ、緑茶中の葉酸は生体利用率が低いことが、血漿、肝臓、骨髄の葉酸濃度、血漿ホモシステイン濃度の変化から示唆された。この点をさらに明確にするためには緑茶中の葉酸の形態を踏まえたさらなる検討が必要である。

## E. 結論

葉酸の微生物学的測定法により、体内葉酸レベルの評価系を構築した。短期的ならびに中長期的な葉酸摂取状態の評価には血漿が適していると考えられた。食品中の多様な形態の葉酸の生体利用率を評価する実験系としてラットに低葉酸食を摂取させる実験系を設定し、緑茶中の葉酸の生体利用率を評価したところ、緑茶中の葉酸の生体利用率は低いことが示唆された。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 発表論文

なし

### 2. 学会発表

遠藤香、村上昌弘、杉澤彩子、木村典代、山田和彦、梅垣敬三：ラットにおける体内葉酸レベルの評価方法に関する検討、第 52 回日本栄養改善学会学術総会(徳島)、平成 17 年 9 月 29 日。

## H. 知的財産件の出願・特許状況(予定を含む)

なし

## I. 引用文献

1. Imaeda N, Goto C, Tokudome Y, Ikeda M, Maki S, Tokudome S. Folate intake and food sources in Japanese female dietitians. *Environ Health Prev Med.* 7:156-161. 2002
2. Wilson SD and Horne DW, Use of glycerol-cryoprotected *Lactobacillus casei* for microbiological assay of folic acid. *Clin Chem.* 28:1198-1200. 1982
3. O'Broin S and Kelleher B. Microbiological

- assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. *J Clin Pathol*, 45:344-347. 1992
4. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*. 127:838S-841S. 1997
  5. O'Leary K, and Sheehy PJ. Effects of preparation and cooking of folic acid-fortified foods on the availability of folic acid in a folate depletion/repletion rat model. *J Agric Food Chem*. 49:4508-4512. 2001
  6. Frick B, Schrocksnadel K, Neurauter G, Wirleitner B, Artner-Dworzak E, and Fuchs D. Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC. *Clin Chim Acta*. 331: 19-23. 2003
  7. 岩井和夫, 小橋昌裕, 沖中靖, 外林秀紀, 谷昌子, 成沢邦明, ビタミン学実験法Ⅱ(水溶性ビタミン日本ビタミン学会編), 東京化学同人, 東京, pp297-354 1985.

表 1 AIN-93G 組成を基本に調製した低葉酸食、基本食、高葉酸食の組成)

	g/kg 飼料		
	低葉酸食	基本食	高葉酸食
コーンスターチ	397.486	397.49	397.486
ビタミンフリーカゼイン(蛋白 85%以上)	200	200	200
糊化コーンスターチ(90~94% 六炭糖)	132	132	132
ショ糖	100	100	100
大豆油(無添加物)	70	70	70
繊維(ソルカーブロック)	50	50	50
ミネラルミックス(AIN-93G-MIX)	35	35	35
葉酸を除いた AIN93G のビタミンミックス (AIN-93-VX)	10	10	10
L-シスチン	3	3	3
重酒石酸コリン(41.1%コリン)	2.5	2.5	2.5
第三ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014
葉酸	0	0.002	0.04

表 2 Dyets 社製の低葉酸食、基本食、高葉酸食の組成

	Dietary folate level		
	Low (0mg/kg diet)	Basal (2mg/kg diet)	High (8mg/kg diet)
	g/kg		
L-Alanine	3.5	3.5	3.5
L-Arginine (free base)	11.2	11.2	11.2
L-Asparagine · H <sub>2</sub> O	6.82	6.82	6.82
L-Aspartic Acid	3.5	3.5	3.5
L-Cystine	3.5	3.5	3.5
L-Glutamic Acid	35	35	35
Glycine	23.3	23.3	23.3
L-Histidine (free base)	3.3	3.3	3.3
L-Isoleucine	8.2	8.2	8.2
L-Leucine	11.1	11.1	11.1
L-Lysine HCl	18	18	18
L-Methionine	8.2	8.2	8.2
L-Phenylalanine	11.6	11.6	11.6
L-Proline	3.5	3.5	3.5
L-Serine	3.5	3.5	3.5
L-Threonine	8.2	8.2	8.2
L-Tryptophan	1.74	1.74	1.74
L-Tyrosine	3.5	3.5	3.5
L-Valine	8.2	8.2	8.2
Total Amino Acids	175.86	175.86	175.86
Dextrin	397	397	397
Sucrose	197.04	196.64	189.04
Cellulose	50	50	50
Corn Oil (stab. 0.15% BHT)	100	100	100
Salt Mix	50	50	50
Vitamin Mix (Folate Free)	10	10	10
Choline Chloride	2	2	2
Sodium Acetate	8.1	8.1	8.1
Folic Acid/Sucrose Premix(5mg/g)	0	0.4	0
Folic Acid/Sucrose Premix(1mg/Kg)	0	0	8
Succinyl Sulfathiazole	10	10	10



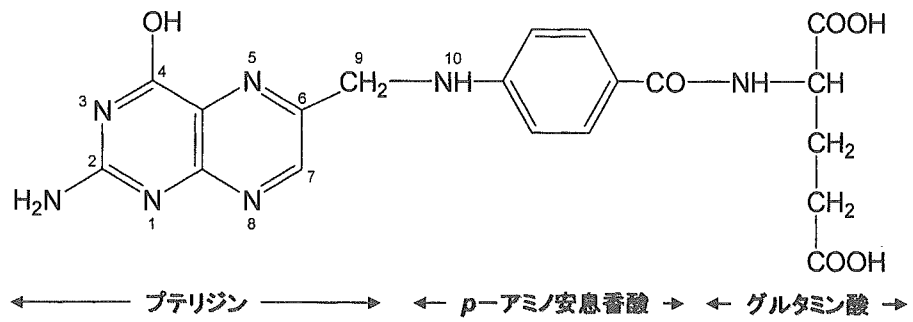


図 1. Folic Acid (PteGlu1 : Pteroylmonoglutamic Acid) の構造式

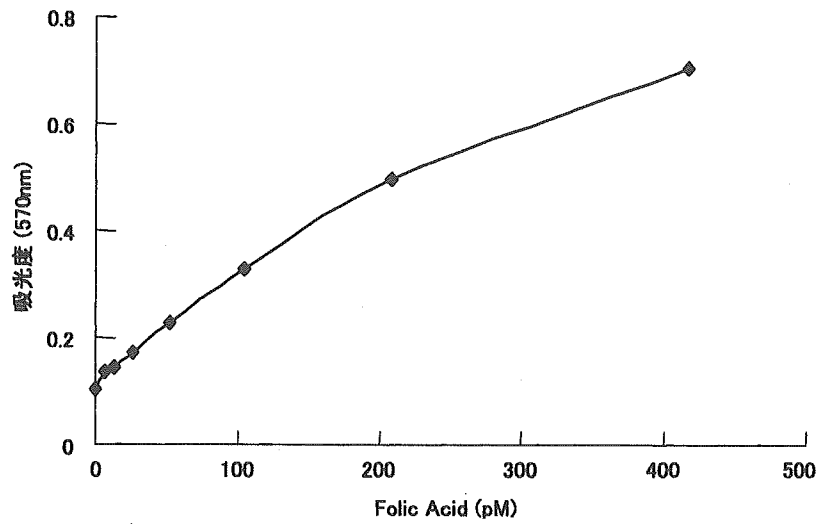


図 2. バイオアッセイによる葉酸定量法の検量線

平成 17 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

#### 8. ビタミン B<sub>2</sub> 栄養の低下がビタミン B<sub>6</sub> 栄養に及ぼす影響について

分担研究者 早川享志 岐阜大学 教授  
研究協力者 三嶋智之 岐阜大学 特別協力研究員

##### 研究要旨

13 種のビタミンはそれぞれに特異的な生理作用を持っており、それぞれが独立した機能を有している。しかし、あるビタミンが別のビタミンに対して影響をする場合がある。こうしたビタミン-ビタミン相互作用の例としてビタミン B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>) とビタミン B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) を取り上げ、B<sub>2</sub> 栄養の低下が B<sub>6</sub> 栄養状態にどのような影響を及ぼすのかについてラットを用いた動物実験により検討を試みた。4 週齢の Wistar/ST 系 Clean 雄ラットを AIN-76 標準飼料で予備飼育後、AIN-76 標準飼料を対照に同飼料から B<sub>2</sub> のみを除いた B<sub>2</sub> 欠乏飼料を 3 週間与えた。その結果、尿中への総 B<sub>2</sub> 排泄量は 1 週間目に既に低値を示し、飼育後の血漿総 B<sub>2</sub> 濃度および肝臓中総 B<sub>2</sub> 含量は約半分程度に低下していた。B<sub>6</sub> については、血漿のピリドキサール (PL) やピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) 濃度には差が見られなかったが、B<sub>2</sub> 欠乏群の肝臓 PLP 含量は有意に低下し、それとは反対にピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) 含量は有意に増加した。これは、肝臓における PMP からの PLP の変換反応が損なわれていることを示すデータであると考えられた。つまり、PMP やピリドキシン 5'-リン酸 (PNP) から PLP への変換にかかわる酵素 PMP/PNP oxidase が B<sub>2</sub> (フラビンモノヌクレオチド: FMN) 酵素であり、この酵素が B<sub>2</sub> 欠乏の影響を受けて活性が低下したために肝臓における B<sub>6</sub> プロフィールが変化したと考えられた。本研究において、B<sub>2</sub> 栄養の低下が B<sub>6</sub> 栄養状態に影響を及ぼすことを *in vivo* において明らかにした。

## A. 目的

ビタミンには 13 種類のビタミンがあるが、それぞれまったく別の化合物であり、各ビタミンは特有な働きを持っている。しかし、あるビタミンが別のビタミンに影響を及ぼす場合がある。こうしたビタミン-ビタミン相互作用についてはこれまでほとんど調べられていない。食事由来のビタミン B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) は通常遊離型として吸収され、体内において補酵素型に変換されて利用される。その変換過程には別の水溶性ビタミンであるビタミン B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>) がかかわる反応がある。したがって、B<sub>2</sub> 栄養状態が B<sub>6</sub> の栄養状態に影響を及ぼすことが考えられ、過去においても指摘はされているが<sup>1)</sup>、*in vivo* における知見は見あたらない。そこで本研究においては、ビタミン-ビタミン相互作用の例として B<sub>2</sub> 栄養の低下がビタミン B<sub>6</sub> 栄養状態にどのような影響を及ぼすのかについてラットを用いた動物実験を行い基礎的な検討を行うことを目的とした。

## B. 実験方法

### 1. 試薬

飼料に用いたビタミンフリーカゼイン、 $\alpha$ -コーンスターチ、セルロースパウダー、AIN-76 ビタミン混合、AIN-76 ミネラル混合はオリエンタル酵母工業株式会社より、メチオニンおよび重酒石酸コリンは和光純薬工業株式会社より、レチノール酢酸は Sigma Chemical Co. より、その他の用いた試薬はナカライテスク株式会社より購入した。

分析に用いた試薬については、ピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) は和光純薬工業株式会社より、アセトニトリル (HPLC グレード)、メタノール (HPLC グレード) は関東化

学株式会社より、ルミフラビンは Sigma Chemical Co. より、その他の用いた試薬はナカライテスク株式会社より購入した。

### 2. 実験動物の飼育法

本実験は、岐阜大学応用生物科学部動物実験委員会の承認を受けた。実験動物は 4 週齢 (体重 80~100 g) 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。飼育室の温度は 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C に設定し、明暗 12 時間サイクル (6:00~18:00) とした。ラットは 5 連の個別ゲージに入れ、実験環境に慣らすために AIN-76 標準飼料で 3 日間予備飼育した。予備飼育後、体重の平均が等しくなるように各群 7 匹からなる 2 群に分けた。Control 群には AIN-76 標準飼料を、B<sub>2</sub> 欠乏食群 (B<sub>2</sub>-Def. 群) には AIN-76 標準飼料から B<sub>2</sub> のみを除いた B<sub>2</sub> 欠乏飼料を与え 21 日間飼育した。実験飼料は表 1 に示した。飼育期間中、実験飼料および飲料水 (水道水) は自由摂取とした。体重と摂食量は毎日測定し、飼料および飲料水は毎日交換した。尿中の総 B<sub>2</sub> および 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) 排泄量を測定するため、飼育開始 0, 1, 2, 3 週目に 24 時間尿を回収し、分析まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

ラットは本飼育開始後 22 日目にエーテル麻酔下にて開腹した後、1%ヘパリン Na 処理をしたシリンジを用いて腹部大動脈より採血し、脱血死させた。採血した血液は、15 分間遠心分離 (2,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C) して血漿サンプルを採取し、分析まで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。さらに肝臓を摘出し、重量測定後、分析まで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

### 3. 尿中および血漿中の総 B<sub>2</sub> の分析

尿中および血漿中の総 B<sub>2</sub> の分析は、大川らの方法<sup>2)</sup>に従った。すなわち、褐色ねじ付き試験管に 0.07~1.2 μM リボフラビン標準溶液 400 μL をとり、ミリ Q 680 μL, 0.5 M 硫酸 520 μL を加えて攪拌後、80°C で 5 分間インキュベートした。氷上で冷却し、10% TCA 400 μL を加えて攪拌後、遠心管に移して高速微量冷却遠心機 MR-150 (株式会社トミー精工) で 3 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4°C) した。その上清 400 μL を試験管にとり、1 M NaOH 400 μL を加えて攪拌し、試験管の口をパラフィルムで覆った。ここまでの操作は氷上で行い、サンプルの光分解を防ぐために明かりは 60 W の豆電球 1 個のみを使用し、間接照明とした。この試験管を図 1 に示した自作の光分解装置 (光源: 20W 蛍光管 2 本) を用いて、低温室で 30 分間光照射した。光照射後、ドラフト内で氷酢酸 40 μL を加えて攪拌し、0.45 μm のメンブランフィルターに通した濾液の 100 μL を HPLC 分析に供した。

### 3.2. 血漿および肝臓中 B<sub>6</sub> ビタマーおよび尿中 4-ピリドキシン酸の分析

血漿および肝臓中の B<sub>6</sub> ビタマーは柘植らの方法<sup>3)</sup>に従い HPLC により分析した。ピリドキサール 5'-リン酸 (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 (4-PIC-5-P) に変換後、高感度で分析する柘植の方法<sup>4)</sup>を用いた。尿中の 4-PIC は、Gregory と Kirk の方法<sup>5)</sup>により分析した。

#### 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差 (SE) で表し、Student の *t*-test により危険率 5% にて

有意性を判定した。

### C. 結果

飼育期間中の体重増加曲線を図 2 に示した。実験期間中の初体重、最終体重、体重増加量、総飼料摂食量および飼料効率を表 2 に、解剖時の肝臓重量および体重 100 g 当たりの肝臓重量を表 3 に示した。最終体重、体重増加量、総飼料摂食量、飼料効率、解剖時の肝臓重量および体重 100 g 当たりの肝臓重量において B<sub>2</sub>-Def.群は Control 群より有意に低下していた。

尿中総 B<sub>2</sub> 排泄量を図 3 に示した。0 週は Control 群と B<sub>2</sub>-Def.群間に差は見られなかった。しかし B<sub>2</sub>-Def.群において 1 週目で既に有意に低値となり、それ以降も低値のままであった。

血漿総 B<sub>2</sub> 濃度を図 4 に示した。B<sub>2</sub>-Def.群は Control 群よりも有意に低値を示した。肝臓総 B<sub>2</sub> 含量を図 5 に示した。B<sub>2</sub>-Def.群では Control 群よりも有意に低値を示した。

肝臓の PMP, ピリドキサール (PL), PLP および総 B<sub>6</sub> (PMP+PL+PLP) 含量を図 6 に示した。PL については 2 群間に差は認められなかったが、B<sub>2</sub>-Def.群の総 B<sub>6</sub> 含量は Control 群よりも有意差はないが高値を示した。B<sub>2</sub>-Def.群の PLP 含量は有意に低値を示す一方、B<sub>2</sub>-Def.群の PMP 含量は Control 群よりも有意に高値を示した。

血漿の PL, PLP および総 B<sub>6</sub> (PL+PLP) 濃度を図 7 に示した。PL 濃度および PLP 濃度について B<sub>2</sub>-Def.群は Control 群よりも有意ではないが低値を示し、総 B<sub>6</sub> 濃度については B<sub>2</sub>-Def.群が有意に低値を示した。

尿中 4-PIC 排泄量を図 8 に示した。全ての週において B<sub>2</sub>-Def.群の 4-PIC 排泄量は

Control群よりも低値を示す傾向であったが、有意な差はなかった。

#### D. 考察

PMP およびピリドキシン 5'-リン酸 (PNP) を PLP へ変換する PMP/PNP oxidase は補酵素にフラビンモノヌクレオチド (FMN) を要求することから B<sub>2</sub> は B<sub>6</sub> の代謝に深くかかわりを持つと考えられる。そこで本研究においては B<sub>2</sub> 栄養の低下が B<sub>6</sub> 栄養状態にどのように影響するのかについて検討した。

ラットに B<sub>2</sub> 欠乏飼料を投与すると摂食量および体重増加量が減少し、肝臓中総 B<sub>2</sub> 含量も減少すると報告されている<sup>6,7)</sup>。今回、B<sub>2</sub> 欠乏飼料で3週間飼育した場合も同様な結果であった。さらに尿中 B<sub>2</sub> 排泄量は B<sub>2</sub> 欠乏飼料の投与後、1週間目で著しい低下が見られ、B<sub>2</sub> 欠乏飼料投与への応答が早期に出てくることが確認された。解剖時のラット血漿総 B<sub>2</sub> 濃度および肝臓総 B<sub>2</sub> 含量は、約半分程度に低下しており、体内 B<sub>2</sub> レベルの低下が確認できた。

肝臓 B<sub>6</sub> ビタマー含量は、PL には違いが見られなかったが、PLP は B<sub>2</sub>-Def.群では有意な低下が認められ、一方、PMP は PLP とは逆に B<sub>2</sub>-Def.群で増加していた。この結果は、肝臓総 B<sub>2</sub> 含量の低下に伴い FMN を補酵素とする PMP/PNP oxidase 反応が律速となり PMP の PLP への変換が低下したことによると考えられた。そこで、肝臓中総 B<sub>2</sub> 含量と肝臓中 PLP 含量についての相関係数は 0.661 であった。一方、肝臓中総 B<sub>2</sub> 含量と肝臓中 PMP 含量についての相関係数は -0.632 であった。何れも危険率 5% で有意であった。これらの結果は、先の予測を支持

する結果である。

体内の B<sub>6</sub> 栄養状態を反映する血漿 PLP も B<sub>2</sub>-Def.群で低下が見られた。これは、ひとつには肝臓での PLP 量を反映したとも考えられる。しかし、Control 群および B<sub>2</sub>-Def.群の血漿中の B<sub>6</sub> ビタマー比 (PL:PLP) が等しいことより、B<sub>2</sub> 栄養の低下による摂食量自体の低下を反映している可能性も否めず、血漿 PLP の低下を B<sub>2</sub> 欠乏だけに帰することはできない。この点は、別の条件において検討する必要がある。なお、血漿総 B<sub>2</sub> 濃度と血漿 PLP 濃度についての相関係数は 0.423 であった。また、血漿総 B<sub>2</sub> 濃度と血漿 PL+PLP 濃度についての相関係数は 0.456 であった。これも危険率 5% での有意性は認められなかった。

Fass ら (1969)<sup>8)</sup> は摂取するリボフラビン量が低下してもフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) の体内濃度が大きく変化しないと報告している。これは FAD synthase 活性が上昇し、リボフラビンおよび FMN を低下させても FAD を保存しようとするはたらきが体内に存在するからである。B<sub>2</sub>-Def.群の尿中 4-PIC 排泄量が Control 群より低値であるものの近い値を示したのは、FAD を補酵素に要求する aldehyde oxidase 活性の低下によるものというよりはむしろ、摂食量低下に伴う B<sub>6</sub> 摂取量の低下を反映したものであると考えられる。これは血漿の PL, PLP および総 B<sub>6</sub> (PL+PLP) 濃度が B<sub>2</sub>-Def.群で Control 群よりも低いこと、B<sub>6</sub> の体内濃度を一定に保つために余剰の B<sub>6</sub> は尿中に 4-PIC として排泄されることから支持できる。今回の B<sub>2</sub> 栄養の低下はラットの成長に若干の低下がみられる程度であり、B<sub>2</sub> 不足の程度はあまり強くないと考えられ

る。しかし、B<sub>2</sub>不足の程度が強い場合には、上記の機構により肝臓のFAD含量を維持することができなくなり、aldehyde oxidase 活性低下に伴う尿中 4-PIC 排泄量の低下が起こることは考えられるので、4-PIC の測定は必要と考えられる。

また、先の FAD 維持機構で示した FAD とは異なり FMN は B<sub>2</sub> 欠乏により低下しやすく、FMN を補酵素とする PMP/PNP oxidase は肝臓の細胞質に局在するので B<sub>2</sub> 栄養の低下の影響を受けやすいと考えられる。本実験において B<sub>2</sub>-Def. 群で見られた肝臓 B<sub>6</sub> プロフィールは、こうした考えを支持するものであると思われる。

以上の結果より、B<sub>2</sub> 栄養状態が低下すると肝臓での B<sub>6</sub> 代謝に影響し、肝臓の B<sub>6</sub> プロフィールが変わることを明らかにした。本実験のようなビタミン欠乏飼料投与実験においては、体重増加量や飼料摂取量などの低下が伴い、それらの要因が定量的な結果の解釈に影響を及ぼすので Pair-feeding により飼料摂取量を合わせた実験系を取り入れることによりさらに詳細な検討が可能であると考えられる。また、PMP/PNP oxidase 活性については、その測定をあわせて検討することにより B<sub>2</sub> 欠乏による影響をより直接的に示すことができると考えられる。こうした点を考慮して更なる検討が望まれる。

#### 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

- 1) McCormick, DB (1989) Two interconnected B vitamins: riboflavin and pyridoxine. *Physiol Rev* 69(4): 1170-1198.
- 2) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1982) A simple method for micro-determination of flavins in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int* 4(2): 187-194.
- 3) Tsuge H, Oda T, Miyata H (1986) Separation and determination of vitamin B<sub>6</sub> derivatives by reversed-phase HPLC. *Agric Biol Chem*, 50, 195-197.
- 4) 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.
- 5) Gregory FJ, Kirk RJ (1979) Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*, 32, 879-883.
- 6) Bessey, OA, Lowry, OH, Love, RH (1949) The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues. *J Biol Chem*

180(2): 755-769.

- 7) Lakshmi AV, Bamji MS (1974) Tissue pyridoxal phosphate concentration and pyridoxamine phosphate oxidase activity in riboflavin deficiency in rats and man. *Br J Nutr* 32(2): 249-255.
- 8) Fass, S Rivlin RS (1969) Regulation of riboflavin-metabolizing enzymes in riboflavin deficiency. *Am J Physiol* 217(4): 988-991.

表1. 実験飼料組成

Ingredients	Control	B <sub>2</sub> -Def.
	(%)	
Vitamin-free casein	20.0	20.0
Soybean oil	5.0	5.0
Sucrose	50.0	50.0
$\alpha$ -Cornstarch	15.0	15.0
Cellulose powder	5.0	5.0
AIN-76 vitamin mixture	1.0	-
Vitamin B <sub>2</sub> - free vitamin mixture	-	1.0
AIN-76 mineral mixture	3.5	3.5
DL-Methionine	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2

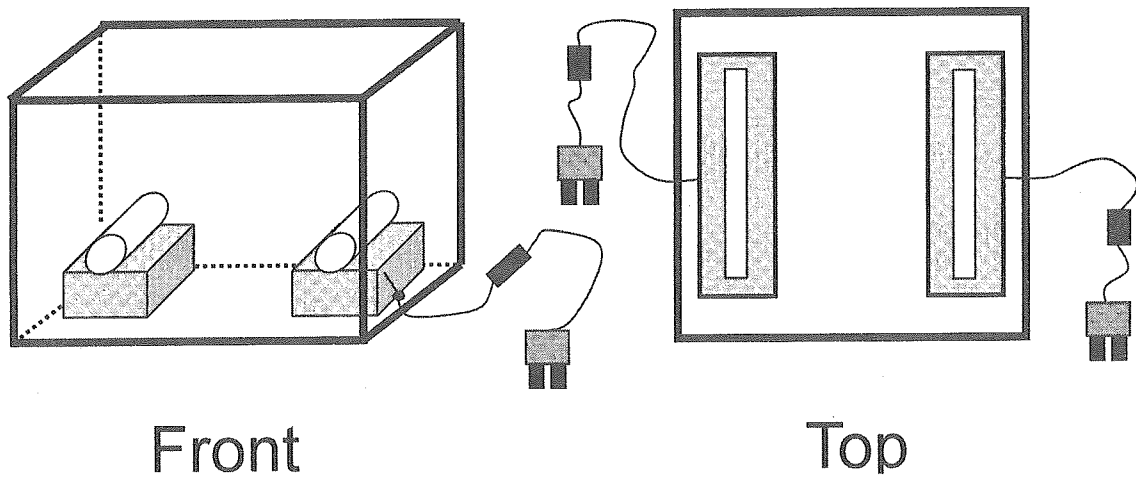


图1. 光分解装置



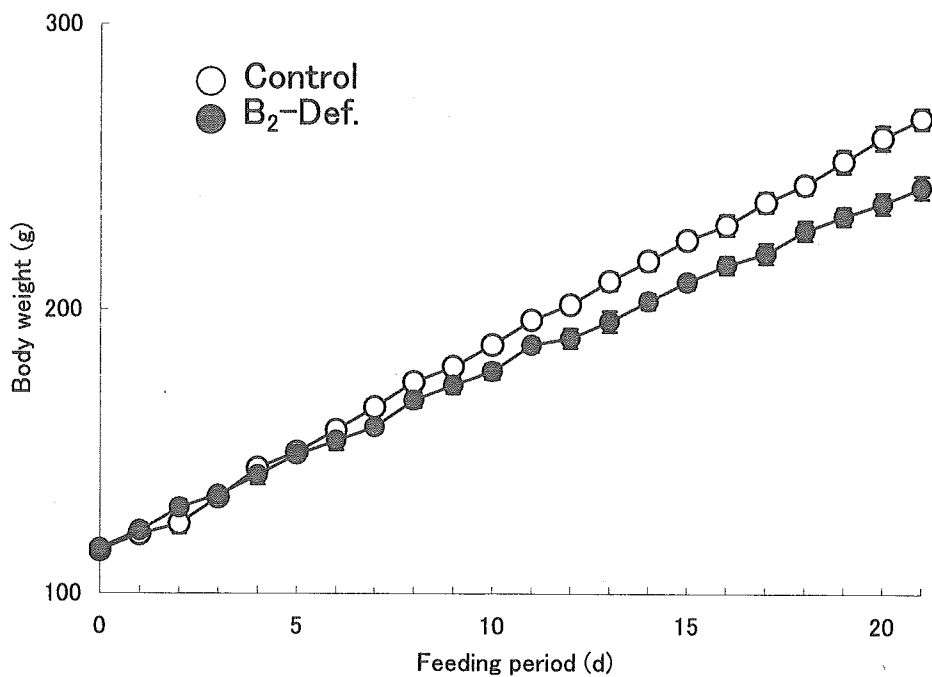


図2. ラットの成長曲線

表2. ラットの初体重, 終体重, 体重増加量, 飼料摂取量および飼料効率

	Control	B <sub>2</sub> -Def.
Initial body weight (g)	115 ± 2	116 ± 2
Final body weight (g)	267 ± 4	243 ± 4*
Body weight gain (g)	152 ± 3	127 ± 3*
Total food intake (g)	349 ± 9	320 ± 7*
Feed efficiency <sup>#</sup>	0.436 ± 0.007	0.407 ± 0.010*

Values are means ± SE (n=7).

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

# Feed efficiency = Body weight gain / Total food intake

表3. ラットの肝臓重量

	Control	B <sub>2</sub> -Def.
Liver (g)	11.62 ± 0.33	8.64 ± 0.27*
Liver (g/100g body wt)	4.35 ± 0.09	3.55 ± 0.06*

Values are means ± SE (n=7).

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

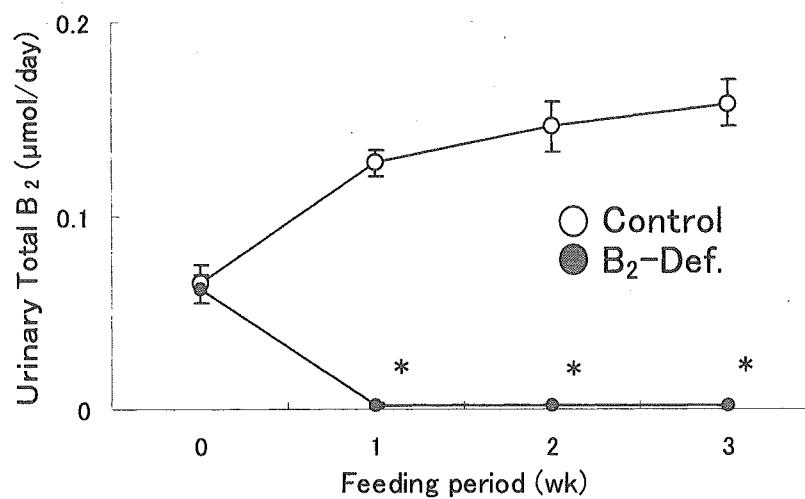


図3. 尿中総ビタミンB<sub>2</sub>排泄量

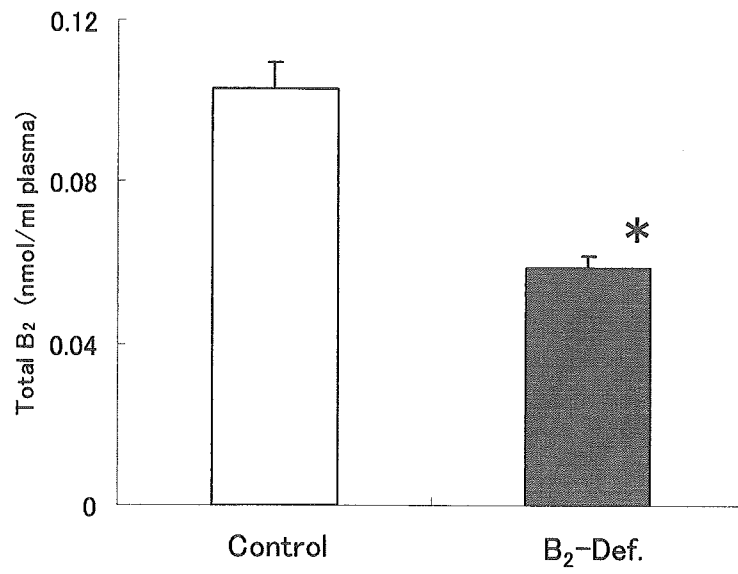


図4. 血漿中総ビタミンB<sub>2</sub>濃度

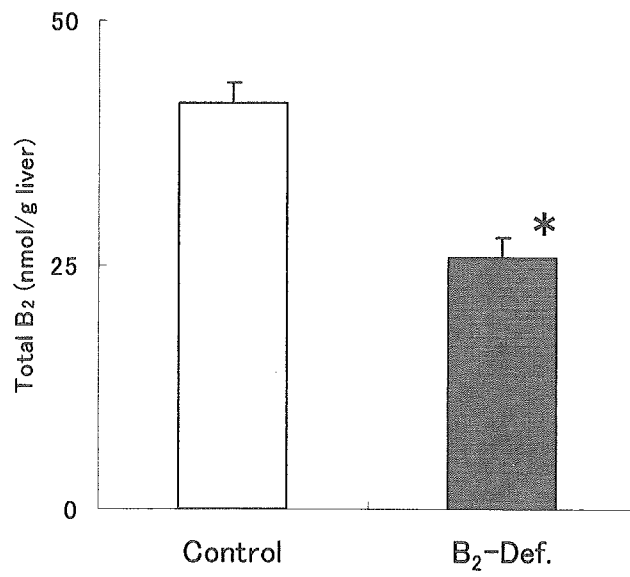


図5. 肝臓中総ビタミンB<sub>2</sub>含量

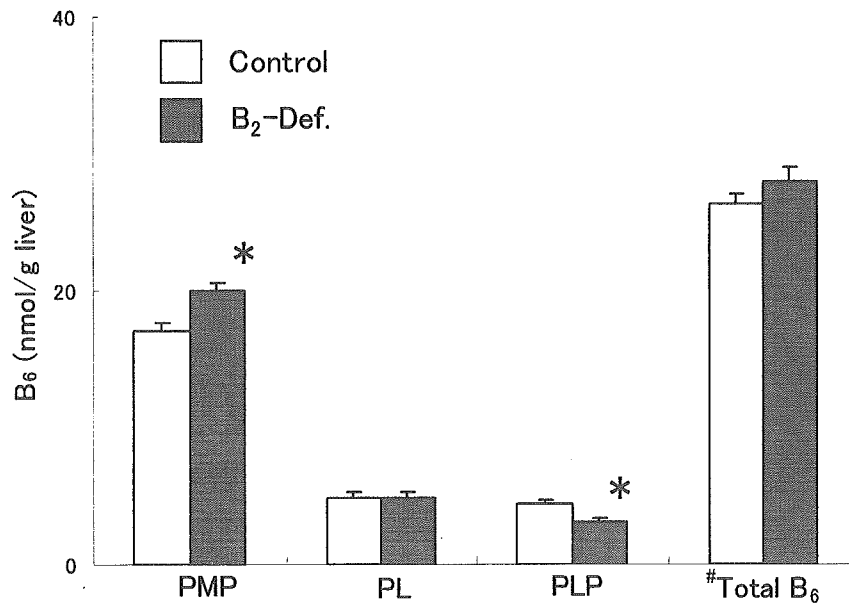


図6. 肝臓中 B<sub>6</sub> ビタミン含量  
(Total B<sub>6</sub> = PMP + PL + PLP)

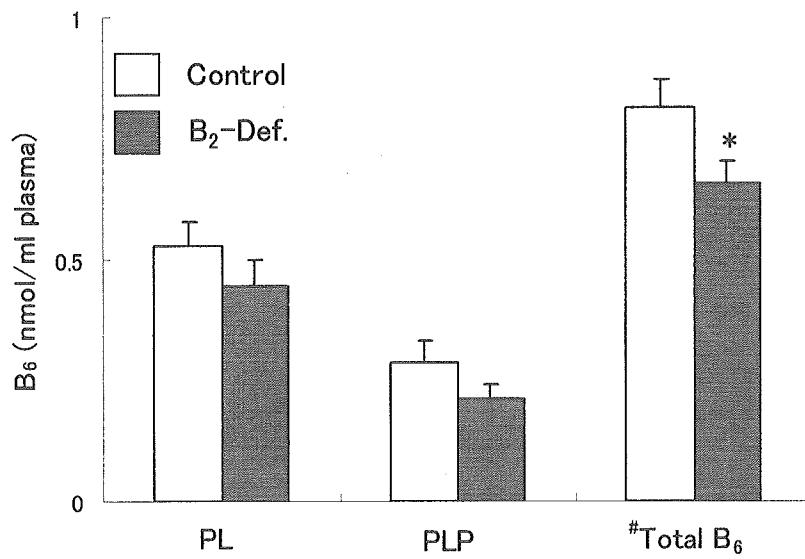


図7. 血漿中 B<sub>6</sub> ビタミン濃度  
(Total B<sub>6</sub> = PL + PLP)