

ビオチンとナイアシンに関しては、地域差や産後の月数による変動は認められず、昨年度とほぼ同じ測定値であり、また食事摂取基準での採用値ともほぼ同値を示した(表 5)。

しかしながら、ビタミン B₆ とビタミン B₁₂ に関しては、地域差や産後の月数の測定値への影響は認められなかったにも拘らず、食事摂取基準での採用値との間に大きな差があった。

そこで今までに日本人の母乳に含まれるビタミン B₆、B₁₂ について測定した報告を、それぞれ表 6 と表 7 にまとめた。

1. ビタミン B₆ (表 6)

最近の文献で日本人の母乳中ビタミン B₆ について報告している論文は少なく、2004 年の伊佐ら⁷⁾ の報告と、2005 年の Sakurai⁸⁾ らの報告のみである。よって 2005 年版の食事摂取基準では、伊佐ら⁷⁾ の報告による母乳 25 サンプルのみを測定したデータが採用されている。また、これらの日本人母乳のデータと我々の測定結果を比べてみると、伊佐ら⁷⁾ のように HPLC 法で測定した場合と Sakurai⁸⁾ ら、及び我々のように微生物定量法で測定した場合は、微生物定量法の方が測定値が低くなった。

本実験にて H17 年度と異なるサンプルを測定した際にも、H17 年度と同じくおよそ 0.1 mg / L という測定値が得られたことから、母乳中のビタミン B₆ 含量を微生物定量法で測定すると、0.1 mg / L 前後という数値が得られることが明確となった。

2. ビタミン B₁₂ (表 7)

1996 年の井戸田ら⁹⁾ の報告が、2005 年

版の食事摂取基準で採用されている。これまで日本人の母乳中ビタミン B₁₂ についての報告は、井戸田ら、Sakurai⁸⁾ ら、渡辺ら(2005)¹⁰⁾、渡辺ら(2006)¹¹⁾ があるが、どの報告も前処理方法をはじめ定量方法は同じであるにも拘らず測定値は 0.2 μg / L から 0.94 μg / L と大きな差異が認められた。

以上のことにより、母乳中のビタミン B₆ 含量は定量方法によって異なるが、微生物定量法で測定した場合は 0.1 mg / L 前後であることが明らかとなり、また、母乳中のビタミン B₁₂ 含量については、報告によって測定値に差異が認められることが分かったが、この原因については不明である。ビタミン B₆ については、今後、HPLC 法で母乳中 B₆ 量を測定することを試みる予定である。

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・登録情報(予定を含む)

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. 日本人の食事摂取基準 2005 年度版 厚生労働省 平成 16 年 10 月
2. AOAC International, Official Methods of Analysis, 16th ed., AOAC International, Arlington, VA, 1995.
3. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamazi R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem*, **46**, 5177-5180 (1998).
4. Wright LD, Skeggs HR. Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med*, **56**, 95-98 (1944).
5. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol*, **40**, 491-8 (1994).
6. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **424**, 23-28 (1988).
7. 伊佐保香, 垣内明子, 早川享志. 日本人の母乳中ビタミン B₆ 含量. *ビタミン*, **78**, 369-372 (2004).
8. Sakurai T, Furukawa M, Asoh M, Kanno T, Kojima T and Yonekubo A. Fat-soluble and Water-Soluble Vitamin Contents of Breast Milk from Japanese Women. *J Nutr Sci Vitaminol*, **51**, 239-247 (2005).
9. 井戸田正, 菅原牧裕, 矢賀部隆史, 佐藤則文, 前田忠夫. 最近の日本人乳組成に関する全国調査 (第十報), 水溶性ビタミン含量について. *日本小児栄養消化器病学会雑誌*, **10**, 11-20 (1996).
10. 渡邊敏明, 谷口歩美, 庄子佳文子, 稲熊隆博, 福井徹, 渡邊文雄, 宮本恵美, 橋詰直孝, 佐々木晶子, 戸谷誠之, 西牟田守, 柴田克己. 日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討. *ビタミン*, **79**, 573-581 (2005).
11. 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金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 平成 17 年度総括・分担研究報告書 (p.258)
12. West KD, Kirksey A. Influence of vitamin B₆ intake on the content of the vitamin in human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **29**, 961-969 (1976).
13. Marlene W Borschel : Effects of Vitamin B₆ intake on nutriture and growth of young infants. *The American Journal of Nutrition*, **43**, 7-15 (1986).
14. Sharon M.S, Claire Z, M.R.Thomas. The effects of ascorbic acid, vitamin B₆, vitamin B₁₂, and folic acid supplementation on the breast milk and maternal nutritional status of low socioeconomic lactating women,

- Am.J.Clin.Nutr*, **34**,1338-1346 (1981) .
15. Reinken L, Dockx F. Vitamin B₆-and Protein Concentrations in Breast Milk from mothers of Preterm and Term Infants. *Klin Padiat.***197** 40-43 (1985) .
 16. Sandberg D.P., M.D., Begley J.A., M.S., Hall C.A., M.D. The content, binding, and forms of vitamin B₁₂ in milk. *The American Journal of Clinical Nutrition* **34**,1717-1724 (1981) .
 17. Jennifer E.C., Lindsay H.A., Marie T.R. Bitamin B-12 Deficiency Is Very Prevalent in Lactating Guatemalan Women and Their Infants at Three Months Postpartum .*J Nutr*,**127**,1966-1972 (1997) .

表 1. 2005 年版食事摂取基準での採用値と昨年度の本研究班測定値の比較

ビタミン名 (単位)	2005 年版 食事摂取基準採用値	H17 年度 本研究班測定値
ビタミン B ₁ (mg/L)	0.15	0.12 ± 0.06
ビタミン B ₂ (mg/L)	0.40	0.39 ± 0.13
ビタミン B ₆ (mg/L)	0.25	0.10 ± 0.04
ビタミン B ₁₂ (µg/L)	0.20	0.68 ± 0.26
ビタミン C (mg/L)	50	46 ± 11
葉酸 (µg/L)	54	46 ± 22
ビオチン (µg/L)	5.2	4.6 ± 2.6
パントテン酸 (mg/L)	5.0	7.0 ± 2.5
ナイアシン (mg/L)	2.0	1.4 ± 0.5

表 2. 一般乳酸菌接種用培地の組成 39.6g (1L)分中

酵母エキス	5.5 g	硫酸マンガン	5 mg
酢酸ナトリウム	10 g	リン酸二水素カリウム	0.25 mg
ペプトン	12.5 g	硫酸第一鉄	5 mg
硫酸マグネシウム	0.1 g	リン酸一水素カリウム	0.25 mg
ブドウ糖	11 g		

表 3. ビタミン B₆ 定量用基礎培地の組成 130 g (1L) 分中

カザミノ酸	8 g	塩化カルシウム	250 mg
イノシトール	50 mg	硫酸マグネシウム	250 mg
塩酸チアミン	500 µg	硫酸マンガン	5 mg
ニコチン酸	5 mg	リン酸二水素カリウム	1.1 g
パントテン酸カルシウム	5 mg	塩化第二鉄	5 mg
ビオチン	16 µg	クエン酸カリウム	10 g
塩化カリウム	850 mg	クエン酸	2 g
ブドウ糖	100 g		
pH5.2 ± 0.1			

表 4. ビタミン B₆ 定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	5ng/ml ピリドキシン 塩酸塩標準 (μ l)	終ピリドキシン塩 酸塩標準濃度 (ng / tube)	H ₂ O (μ l)	ビタミン B ₆ 定量用基礎培地 (ml)	Total (ml)
0	0	0.0	1000	1	2
1	40	0.1	960	1	2
2	80	0.2	920	1	2
3	120	0.3	880	1	2
4	160	0.4	840	1	2
5	200	0.5	800	1	2
6	240	0.6	760	1	2
7	400	1.0	600	1	2
試料	<i>a</i>	<i>x</i>	1000- <i>a</i>	1	2

表 5. 2005 年版食事摂取基準採用値，昨年度の本研究班測定値，本実験の測定値の比較

ビタミン名 (単位)	2005 年版 食事摂取基準 採用値	H17 年度 本研究班測定結果	本実験での 測定結果
ビタミン B ₆ (mg / L)	0.25	0.10 \pm 0.04	0.086 \pm 0.039
ビタミン B ₁₂ (μ g / L)	0.20	0.68 \pm 0.26	1.3 \pm 0.3
ビオチン (μ g / L)	5.2	4.6 \pm 2.6	4.9 \pm 2.0
ナイアシン (mg / L)	2.0	1.4 \pm 0.5	1.4 \pm 0.5

表 6. 母乳中ビタミン B₆ についてのこれまでの報告

文献	n 数	mg / L	定量方法
West KD <i>et al.</i> , '76 ¹²⁾	19	0.13	微生物定量法
Marlene W <i>et al.</i> , '86 ¹³⁾	8	0.15~0.21	微生物定量法
Sharon M <i>et al.</i> , '81 ¹⁴⁾	7	0.12	微生物定量法
Reinken L <i>et al.</i> , '85 ¹⁵⁾	24	0.35	HPLC
伊佐ら '04 ⁷⁾	25	0.25	HPLC
Sakurai <i>et al.</i> , '05 ⁸⁾	159	0.057 \pm 0.025	微生物定量法
H17 年度当研究班	238	0.10 \pm 0.04	微生物定量法
本実験	58	0.086 \pm 0.039	微生物定量法

表 7. 母乳中ビタミン B₁₂ についてのこれまでの報告

文献	n 数	mg / L	定量方法
Sandberg <i>et al.</i> , '81 ¹⁶⁾	19	0.97	ラジオアッセイ
Jennifer <i>et al.</i> , '97 ¹⁷⁾	92	0.93	ラジオアッセイ
井戸田ら '96 ⁹⁾	2279	0.2	微生物定量法
Sakurai <i>et al.</i> , '05 ⁸⁾	115	0.4 ± 0.2	微生物定量法
渡辺ら '05 ¹⁰⁾	25	0.28 ± 0.14	微生物定量法
渡辺ら '06 ¹¹⁾	126	0.94 ± 0.53	微生物定量法
H17 年度当研究班	194	0.68 ± 0.26	微生物定量法
本実験	58	1.3 ± 0.3	微生物定量法

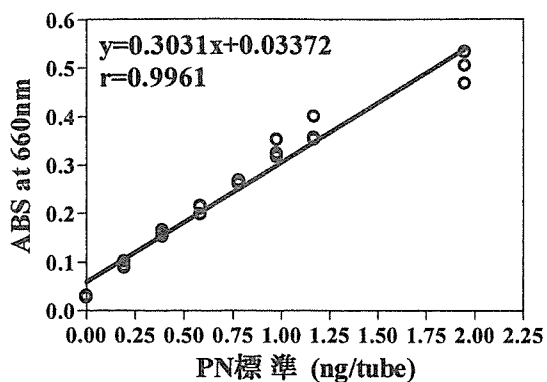


図 1. ピリドキシン相当量に対する *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 のレスポンスの一例

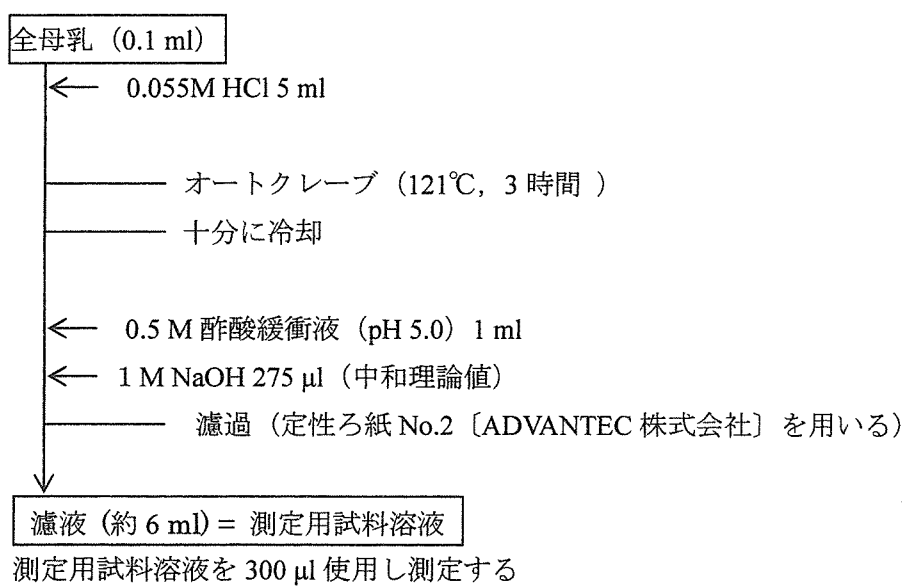


図 2. 母乳中のビタミン B₆ の測定用試料溶液の作成操作

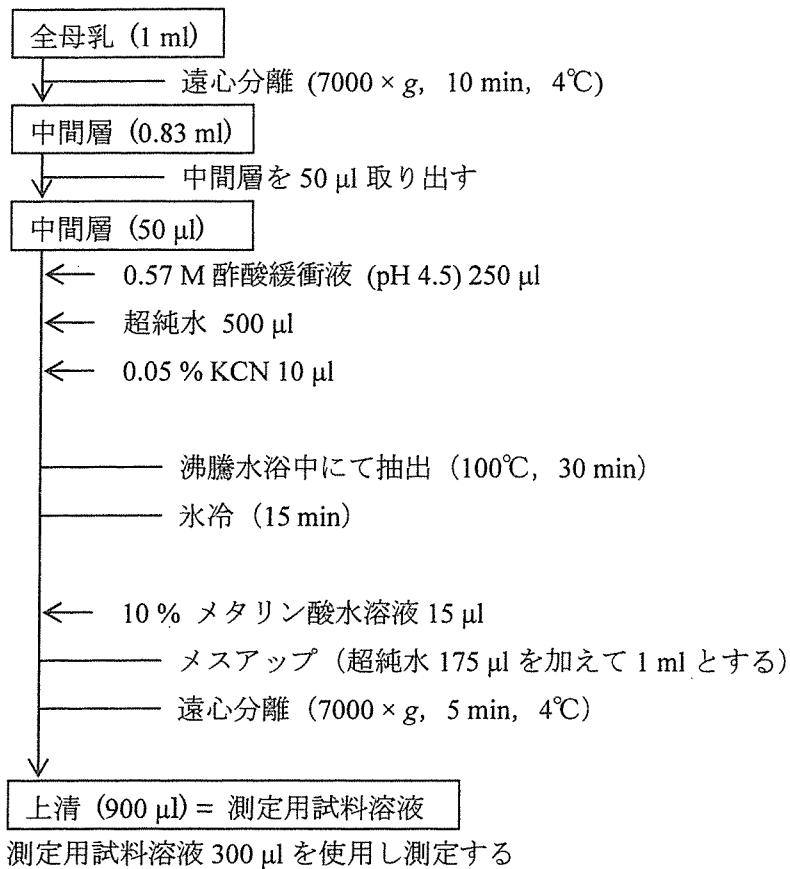


図 3. 母乳中のビタミン B₁₂ の測定用試料溶液の作成操作

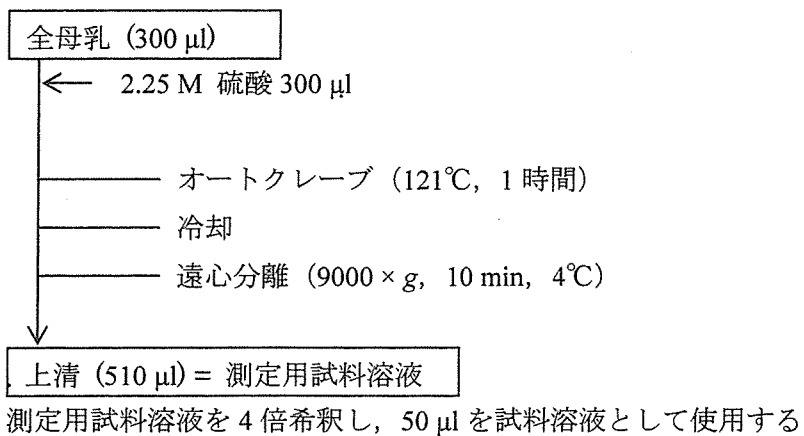


図 4. 母乳中のビオチンの測定用試料溶液の作成操作

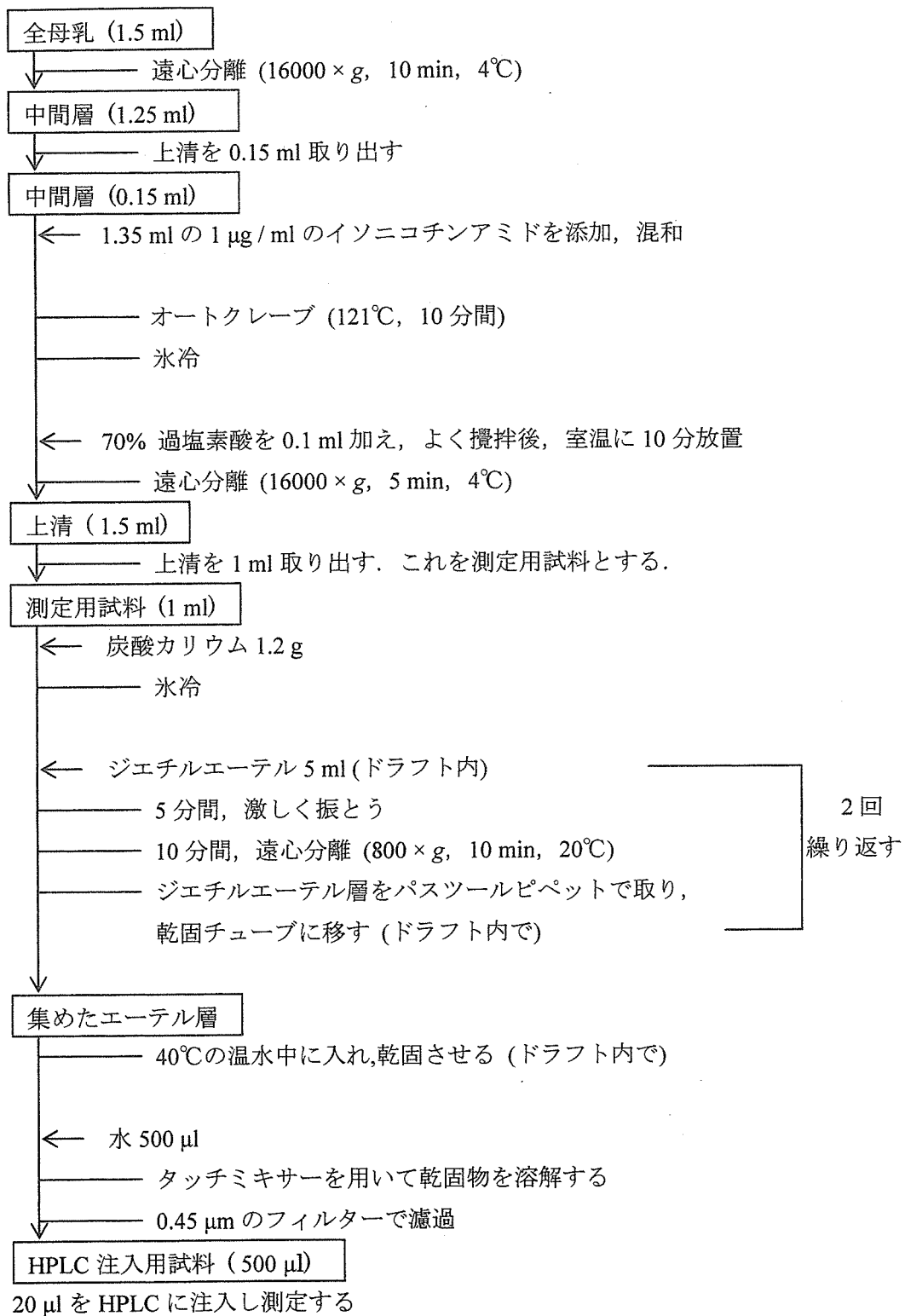


図 5. 母乳中のナイアシンの注入用試料の作成方法

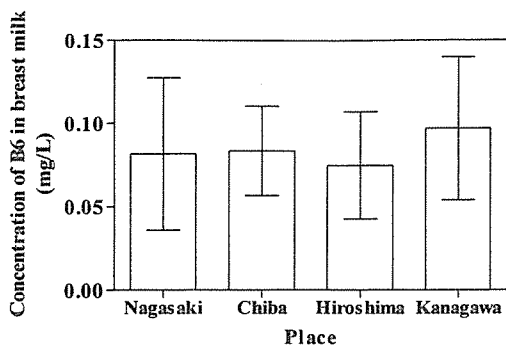


図 6. 母乳中ビタミン B₆ の地域差

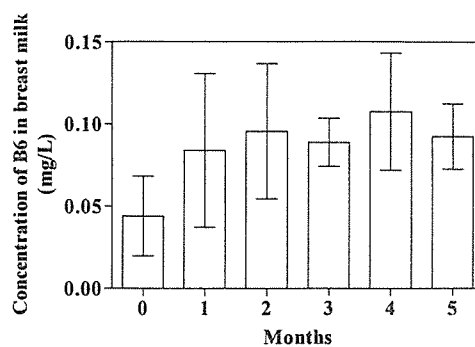


図 7. 母乳中ビタミン B₆ の産後月数別の変動

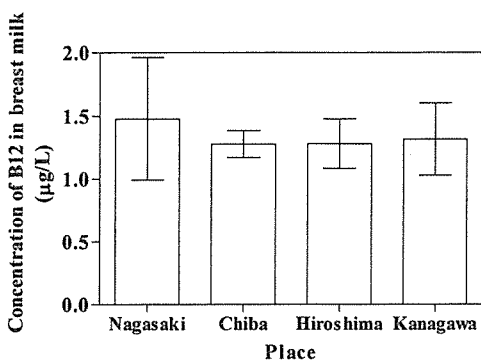


図 8. 母乳中ビタミン B₁₂ の地域差

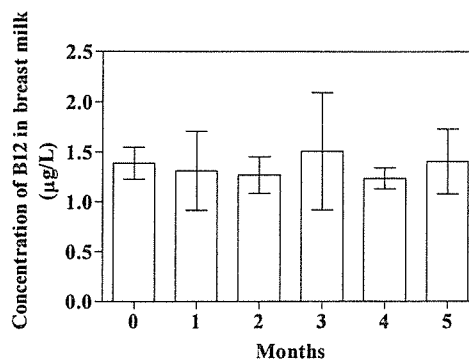


図 9. 母乳中ビタミン B₁₂ の産後月数別の変動

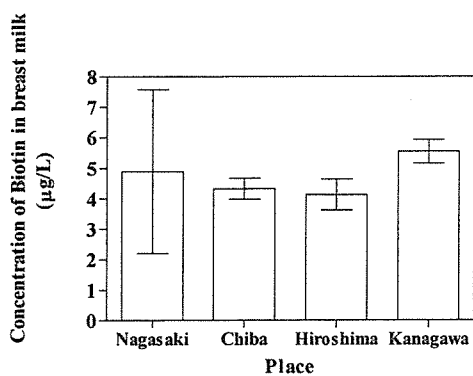


図 10. 母乳中ビオチンの地域差

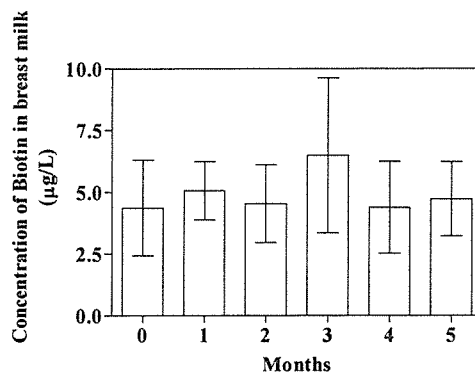


図 11. 母乳中ビオチンの産後月数別の変動

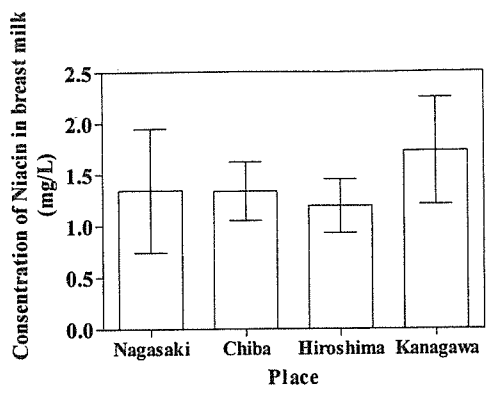


図 12. 母乳中ナイアシンの地域差

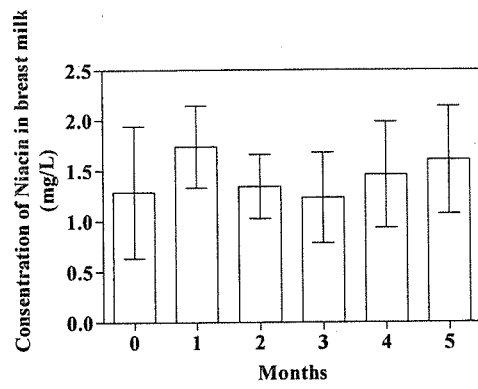


図 13. 母乳中ナイアシンの産後月数別の変動

Ⅲ. 分担研究者の報告書

Ⅲ. 分担研究者の報告書

1. ビタミン B₂ 栄養の低下がビタミン B₆ 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

研究要旨

ビタミンには水溶性 9 種と脂溶性 4 種の合計 13 種類のビタミンがあり、それぞれは特異的な生理作用を持っており、機能についても独立している。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 B₂ (B₂) とビタミン B₆ (B₆) の場合について取り上げ、B₂ 栄養の低下が B₆ 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てきた。本年度は、ピリドキサミン 5'-リン酸 (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 B₂ 酵素（フラビンモノヌクレオチド：FMN）である PMP/PNP oxidase 活性とあわせた結果について報告する。

A. 目的

ビタミンには水溶性 9 種と脂溶性 4 種の合計 13 種類のビタミンがあり、それぞれは特異的な生理作用を持っており、機能についても独立している。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。昨年度の報告においてビタミン B₂ (B₂) 欠乏の飼料で飼育したラットと通常の飼料で飼育したラットの肝臓においては、PMP 含量と PLP 含量が逆転し、B₆ 欠乏ラットでは PLP の有意な低下が、PMP では有意な増加が認められた。そこで、肝臓の PMP/PNP oxidase 活性について検討し、ビタミン B₆ (B₆) の動態の結果とあわせて考察することを目的とした。

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、 α -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 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 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、B₂ 欠乏食群 (B₂-Def. 群) には AIN-76 標準飼料から B₂ のみを除いた B₂ 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 B₂ および 4-ピリドキシン酸 (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°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°C) して血漿サンプルを採取し、分析まで -20°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°C で凍結保存した。

3. 尿中および血漿中の総 B₂ の分析

尿中および血漿中の総 B₂ の分析は、大川らの方法²⁾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 水 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. この試験管を光分解装置 (光源: 20 W 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.

4. 血漿および肝臓中 B_6 ビタミンおよび尿中ピリドキシン酸の分析

血漿および肝臓中の B_6 ビタミンは柘植らの方法³⁾ に従い HPLC により分析した. ピリドキサル 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 (PIC-P) に変換後, 高感度で分析する柘植の方法⁴⁾ を用いた. 尿中の PIC は, Gregory と Kirk の方法⁵⁾ により分析した.

5. 肝臓中 PMP/PNP oxidase 活性の測定

ラット肝臓 1 g あたり 4 ml の 20 mM Potassium phosphate buffer (KPB) (pH 7.0) を

加えホモジナイズし, 高速微量冷却遠心機 MR-150 (株式会社トミー精工) で 30 分遠心分離 (12,000 rpm, 4°C) 後, 得られた上清を臓器抽出液とした. この肝臓抽出液を用いて Wada & Snell および Fonda の方法^{6,7)} の方法に従って PMP を基質として 37°C で 30 分間インキュベート後, 100% TCA を 300 μL 入れ 10 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4°C) し上清中の PLP を phenylhydrazine hydrochloride 2 g を溶かした発色試薬で発色させた. ここまでの操作はすべて暗所で行ない, 410 nm で吸光度を測定し, 生成した PLP 量を求めた. 肝臓サンプル中のタンパク質量は, Lowry 法により牛血清アルブミン (BSA) を標準として測定した. 得られた値から, 比活性値 (nmol PLP/mg protein/h) および肝臓 1 g あたりの活性値を求めた.

統計処理

結果はすべて平均値 \pm 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

実験期間中の初体重, 最終体重, 体重増加量, 総飼料摂食量, 飼料効率および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 2 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_2 -Def. 群は Control 群より有意に低下していた.

血漿総 B_2 濃度および PL, PLP および総 B_6 (PL + PLP) 濃度を表 3 に示した. 総 B_2 濃

度は B₂-Def.群では Control 群よりも有意に低値を示した。PL 濃度および PLP 濃度は B₂-Def.群では Control 群よりも有意ではないが低値を示し、総 B₆ 濃度については B₂-Def.群が有意に低値を示した。

肝臓総 B₂ 含量および PMP, ピリドキサル (PL), PLP および総 B₆ (PMP+PL+PLP) 含量を表 4 に示した。総 B₂ 含量は B₂-Def.群では Control 群よりも有意に低値を示した。PL については 2 群間に差は認められなかったが、B₂-Def.群の総 B₆ 含量は Control 群よりも有意差はないが高値を示した。B₂-Def.群の PLP 含量は有意に低値を示す一方、B₂-Def.群の PMP 含量は Control 群よりも有意に高値を示した。

尿中 PIC 排泄量を表 5 に示した。全ての週において B₂-Def.群の 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。

肝臓 PMP/PNP oxidase については、図 1 および 2 に示した。比活性においても、重量あたりにおいても本酵素活性は、B₂-Def.群で有意な低下を示した。

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 B₂ は B₆ の代謝に深いかわりを持つと考えられる。そこで本研究においては B₂ 栄養の低下が B₆ 栄養状態にどのように影響するのかについて血漿と肝臓の総 B₂ 栄養状態と B₆ 栄養状態についての結果と肝臓 PMP/PNP oxidase

活性の結果について併せて検討することとした。

ラットに B₂ 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 B₂ 含量も減少すると報告されている^{8,9)}。今回、B₂ 欠乏飼料で 3 週間飼育した場合も同様な結果であった。解剖時のラット血漿総 B₂ 濃度および肝臓総 B₂ 含量は、約半分程度に低下しており、体内 B₂ レベルの低下が確認できた。

体内の B₆ 栄養状態を反映する血漿 PLP は B₂-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 B₂-Def.群の血漿中の B₆ ビタマー比 (PL : PLP) が等しいことより、B₂ 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が残されている。なお、血漿総 B₂ 濃度と血漿 PLP 濃度についての相関係数は 0.423 であった (図 3)。また、血漿総 B₂ 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 (図 4)。何れも危険率 5% での有意性は認められなかった。

肝臓 B₆ ビタマー含量は、PL には違いが見られなかったが、PLP は B₂-Def.群では有意な低下が認められ、一方、PMP は PLP とは逆に B₂-Def.群で増加していた。この結果は、肝臓総 B₂ 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 B₂ 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 (図 5)。一方、肝臓中総 B₂ 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(図6)。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。

Fassら(1969)¹⁰⁾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。B₂-Def.群の尿中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B₆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B₆(PL+PLP)濃度がB₂-Def.群でControl群よりも低いこと、B₆の体内濃度を一定に保つために余剰のB₆は尿中にPICとして排泄されることから支持できる。今回のB₂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、B₂不足の程度はあまり強くないと考えられる。しかし、B₂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PIC排泄量の低下が起こることは考えられる。

また、先のFAD維持機構で示したFADとは異なりFMNはB₂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B₂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B₂-Def.群で見られた肝

臓B₆プロフィールとPMP/PNP oxidase活性の結果は、こうした考えを支持するものである。

以上の結果より、B₂栄養状態が低下すると肝臓PMP/PNP oxidase活性が有意に低下し、肝臓でのB₆代謝に影響する結果、肝臓のB₆プロフィールが変わることを明らかにした。

本実験においては、B₆については、十分量摂取した条件における結果である。従って、B₆栄養状態が十分でない場合には、B₂栄養状態の低下は、B₆栄養にもっと強い影響を及ぼすのではないかと考えられる。今後は、B₆栄養状態が十分でない場合のB₂栄養低下の影響について検討することにより、ビタミン-ビタミン相互作用の影響について更なる検討が必要である。

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

木村昌智, 三島智之, 伊佐保香, 柘植治人, 柴田克己, 早川享志, B₂欠乏がビタミンB₆栄養状態に及ぼす影響, 日本ビタミン学会第58回大会一般研究発表, 徳島大学工学部, 2006年5月27日。

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 : 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 : 187-194.
 - 3) Tsuge H, Oda T, Miyata H (1986) Separation and determination of vitamin B₆ 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) Hiroshi, W, Snell, EE (1961) The enzymatic oxidation of pyridoxine and pyridoxamine phosphates. *J Biol Chem* 236(7) : 2089-2095.
 - 7) Fonda, ML (1988) Pyridoxamine (pyridoxine) phosphate oxidase activity in mammalian tissues. *Comp Biochem Physiol* 90B : 731-737.
 - 8) Bessey, OA, Lowry, OH, Love, RH (1949) The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues. *J Biol Chem* 180 : 755-769.
 - 9) 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 : 249-255.
 - 10) Fass, S, Rivlin, RS (1969) Regulation of riboflavin- metabolizing enzymes in riboflavin deficiency. *Am J Physiol* 217 : 988-991.

表1. 実験飼料組成

Ingredients	Control	B ₂ -Def.
	(%)	
Vitamin-free casein	20.0	20.0
Soybean oil	5.0	5.0
Sucrose	50.0	50.0
α-Cornstarch	15.0	15.0
Cellulose powder	5.0	5.0
AIN-76 vitamin mixture	1.0	-
Vitamin B ₂ - 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

表2. 成長パラメーターおよび肝臓重量

	Control	B ₂ -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 [#]	0.436 ± 0.007	0.407 ± 0.010*
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 $P < 0.05$.

表3. 血漿総ビタミンB₂およびB₆ビタミン濃度 (nmol/ml plasma)

	Control	B ₂ -Def.
Total vitamin B ₂	0.103 ± 0.006	0.059 ± 0.003*
PL	0.473 ± 0.029	0.461 ± 0.056
PLP	0.520 ± 0.055	0.336 ± 0.034
Total B ₆ [#]	1.089 ± 0.227	0.828 ± 0.040*

Values are means ± SE (n=7).

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

[#] Total B₆ = PMP + PL + PLP

表4. 肝臓総ビタミンB₂およびB₆ビタミン含量 (nmol/g 肝臓)

	Control	B ₂ -Def.
Total vitamin B ₂	41.5 ± 2.2	25.7 ± 2.1*
PMP	17.1 ± 0.6	20.0 ± 0.6*
PL	4.84 ± 0.43	4.88 ± 0.45
PLP	4.40 ± 0.32	3.16 ± 0.16*
Total B ₆ [#]	26.3 ± 0.8	28.0 ± 0.9

Values are means ± SE (n=7).

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

[#] Total B₆ = PMP + PL + PLP

表5. 尿中4-PIC排泄量 (μ mol/day)

Week	Control	B ₂ -Def.
0	0.605 ± 0.205	0.561 ± 0.168
1	0.555 ± 0.141	0.471 ± 0.45
2	0.462 ± 0.108	0.443 ± 0.119
3	0.763 ± 0.157	0.652 ± 0.163

Values are means ± SE (n=7).