

ン混合食群) とき, 母乳中ビタミン濃度が低い場合

図 10 にビタミン摂取量の違いがビタミン B₁, ビタミン B₂, ビタミン B₆, ビタミン B₁₂ の母乳中濃度に与える影響についてのグラフを示した. 母乳中ビタミン濃度は 0.2% ビタミン混合食群で低い値を示した.

② ビタミン摂取量によって, 母乳中ビタミン濃度が濃度依存的に増加する場合

図 11 にビタミン摂取量がナイアシン, ビオチン, パントテン酸の母乳中濃度に及ぼす影響についてのグラフを示した. これらはビタミン摂取量に対し, 母乳中ビタミン濃度が濃度依存的に増加した.

③ ビタミン摂取量を変化させても, 母乳中ビタミン濃度は変化しない場合

図 12 にビタミン摂取量が葉酸の母乳中濃度に及ぼす影響についてのグラフを示した. これは, ビタミン摂取量を変化させても, 母乳中ビタミン濃度は変化しなかった.

D. 考察

本研究では, ビタミン摂取量が母乳中ビタミン濃度に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした. そのために, ラットに 0.2%, 1.0%, 4.0% ビタミン混合食を与えて, 妊娠・出産させ, ビタミン摂取量が母乳中ビタミン濃度に及ぼす影響について検討した.

ビタミン摂取量が正常な出産・授乳に及ぼす影響については, ビタミン摂取量が大きくなると, 正常な出産・授乳を行うことが可能となった. しかし, この結果は検体数が少なく, 環境によっても左右されると考えるため, 更なる検討が必要である. また, ビタミン摂取量は子ラットの成長に影響を及ぼさなかった. 以上の結果から, 母親のビタミン摂取

量による出産数や子ラットの成長に対する影響は認められないと考えられる.

① に分類されたビタミン B₁, ビタミン B₂, ビタミン B₆, ビタミン B₁₂ は 0.2% ビタミン混合食群で他の 2 群に比べて低い値となった. これらのビタミンは, 母親の摂取量がある点以下であると, 母乳中ビタミン濃度はその摂取量に依存し, ある点を過ぎ, 母乳中のビタミン濃度が飽和状態になると, それ以上母乳に蓄積されることはなく, そのまま尿中に排泄されると考えられる. ヒトに置き換えて考えると, 摂取量がある点以下の場合, サプリメントなどを用い摂取量を増加させる必要があるが, 過剰に摂取した場合でも母乳中ビタミン濃度は一定に保たれ, 子どもにとっては比較的安全なビタミンといえる. 過去にもビタミン摂取量と母乳中ビタミン濃度の関係についての報告がいくつかある. その中で, 両者に関係がみられたと報告しているものとして, ヒトの母乳^{8,9,10)} や, ラットの母乳^{11,12)} があり, ビタミン摂取量が少ないと母乳中ビタミン濃度も低くなることがわかった.

② に分類されたナイアシン, ビオチン, パントテン酸ではビタミン摂取量に対し母乳中ビタミン濃度が濃度依存的に増加した. これら 3 種類のビタミンでは, 母乳中濃度が飽和することはなく, 摂取依存的に母乳中濃度も上昇した. ナイアシンでは 0.2% ビタミン混合食群は 1.0% ビタミン混合食群と変わらない値となった. その理由として, 母乳中ナイアシンの供給源はタンパク質中のトリプトファン, そしてビタミンであるニコチン酸であり, 0.2% ビタミン混合食群ではニコチン酸の摂取量は少ないが, トリプトファンの摂取量は他の群とは変わらない. よって, トリプ

トファンからナイアシン代謝-転換される経路が強く働いたのではないか。一方、4.0%ビタミン混合食群では、トリプトファンからナイアシン代謝-転換される経路が1.0%ビタミン混合食群と同程度の働きをしたが、ニコチン酸が飼料中に過剰に含まれていたため、1.0%ビタミン混合食群に比べて増加したと考えられる。現在の食事摂取基準では、この3種類のビタミンに出産後0~5か月の乳児では大量摂取すると健康障害がでると報告はないため、ナイアシン、パントテン酸、ビオチンともに上限量は定められていない。しかし、母親がサプリメントを摂取し、その影響によって大量のナイアシン、パントテン酸、ビオチンが母乳中にでて、生後間もない乳児が、長期間にわたり大量にそれらが含まれた母乳を飲んだ場合、健康障害がないと断言することはできないため、注意が必要である。過去に牛を用いた実験で、母乳中ビオチン濃度は摂取量に影響されるという報告¹³⁾があるが、ナイアシン、パントテン酸に関しては、摂取量と母乳中濃度との関係について報告された論文はなく、今回の研究で初めて明らかにすることができた。また、初めて全ての水溶性ビタミンを用いて同時に実験することができた。

③に分類された葉酸ではビタミン摂取量を変化させても、母乳中濃度は変化しなかった。過去に行われた本研究室での実験で、ヒト母乳中葉酸濃度は、最小値が5 µg/L、最大値が99 µg/Lであり、約20倍の差がみられ、個人差が大きかった。しかし、これが何によるものなのかは分からなかった。一方、過去に、ラットを用いた実験で、十分に葉酸を摂取させたいうえ、鉄を全く与えなかった群では、鉄を与えた群に比べて母乳中葉酸濃度が減

少したという報告¹⁴⁾がある。このようなケースは、人の場合でも起こると考えれ、母乳中葉酸濃度に影響を与える因子が何か他に要因があることを念頭に置き、妊娠期・授乳期には葉酸の摂取のみにこだわるのではなく、日常的にバランスの良い食生活を送ることが重要である。

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

平成19年 日本栄養・食糧学会中四国・近畿支部合同大会(平成19年11月・東広島市) 母乳中ビタミン濃度に影響を与える栄養因子の検索

○遠藤美佳, 福渡努, 廣瀬潤子, 柴田克己

G. 知的財産権の出願・登録状況(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. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己. 代謝攪乱物質ビスフェノールAのトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位, 食品衛生学雑誌(2004) 45, 231-8.

2. Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K. A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int* (1982) 4, 187-194.
3. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamazi R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, and Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* (1998) 46, 5177-5180.
4. Herbert V. Minimal daily adult folate requirement. *Arch Int Med*, (1962) 110, 649-653.
5. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, and Izumi Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* (1994) 40, 491-498.
6. Skeggs HR, and Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-26.
7. Shibata K, Kawada T, and 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* (1988) 424, 23-28.
8. Nail PA, Thomas MR, Eakin R. The effect of thiamin and riboflavin supplementation on the level of those vitamins in human breast milk and urine. *Am J Clin Nutr*. (1980) 33, 198-204.
9. Hamaker BR, Kirksey A, Borschel MW. Distribution of B-6 vitamins in human milk during a 24-h period after oral supplementation with different amounts of pyridoxine. *Am J Clin Nutr*. (1990) 51, 1062-6.
10. Kang-Yoon SA, Kirksey A, Giacchia G, West K. Vitamin B-6 status of breast-fed neonates: influence of pyridoxine supplementation on mothers and neonates. *Am J Clin Nutr*. (1992) 56, 548-58.
11. Duerden JM, Bates CJ. Effect of riboflavin deficiency on reproductive performance and on biochemical indices of riboflavin status in the rat. *Br J Nutr*. (1985) 53, 97-105.
12. Daniel LJ, Gardiner M, Ottey LJ. Effect of vitamin B₁₂ in the diet of the rat on the vitamin B₁₂ contents of milk and livers of young. *J Nutr*. (1953) 50, 275-89.
13. Rosendo O, Staples CR, McDowell LR, McMahan R, Badinga L, Martin FG, Shearer JF, Seymour WM, Wilkinson NS. Effects of biotin supplementation on peripartum performance and metabolites of Holstein cows. *J Dairy Sci*. (2004) 87, 2535-45.
14. O'Connor DL, Picciano MF, Tamura T, Shane B. Impaired milk folate secretion is not corrected by supplemental folate during iron deficiency in rats. *J Nutr*. (1990) 120, 499-506.

表 1. 試料組成

組成	0.2%群	1.0%群	4.0%群
Casein		20	
L-Methionine		0.2	
Gelatinized cornstarch		46.9	
Sucrose		23.4	
Corn oil		5	
Mineral mixture (AIN-93-MX)		3.5	
Vitamin mixture (AIN-93-VX)	0.2	1.0	4.0
Total		100	

表 2. 出産前後の母ラットの数

群名	全ての母ラットの数 (匹)	搾乳できた数 (匹)	割合* (%)
0.2%ビタミン混合食群	7	3	43
1.0%ビタミン混合食群	8	4	50
4.0%ビタミン混合食群	7	5	71

*全ての母ラットに対する搾乳できた母ラットの割合

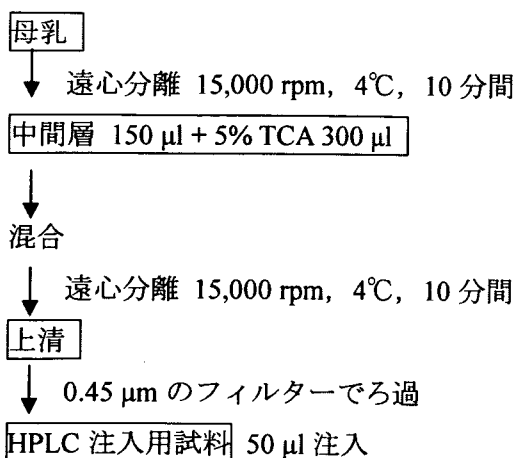


図 1-1 母乳中のビタミン B₁ の注入用試料の作成操作

【測定条件】

移動相 : 0.2 M NaH₂PO₄ 0.3% acetonitrile <<L-6000 Pump HITACHI>>
 流速 1.0ml / min (PRESSURE : 92 kgf / cm²)

反応液 : ①0.01% K₃Fe (CN)₆ <<L-7100 Pump HITACHI>>
 流速 0.5ml / min (PRESSURE : 20kgf / cm²)

②15% NaOH <<L-2130 Pump HITACHI>>
 流速 0.5ml / min (PRESSURE : 9 kgf / cm²)

カラム : 5C₁₈-MS-II (φ 4.6×250 mm)

カラム温度 : 40°C <<L-5020 HITACHI>>

反応コイル温度 : 50°C
 <<L-2350 HITACHI>> <peek チューブ φ0.5 mm×5 m>

検出器 : <<RF-10A_{XL} SHIMADZU>>

検出方法 : 蛍光法 (励起波長 365 nm, 蛍光波長 435 nm)

他の機器 : <<SIL-20AC Auto sumpler SHIMADZU>>
 <<C-R8A CHROMATOPAC SHIMADZU>>

図 1-2 母乳中のビタミン B₁ の測定条件

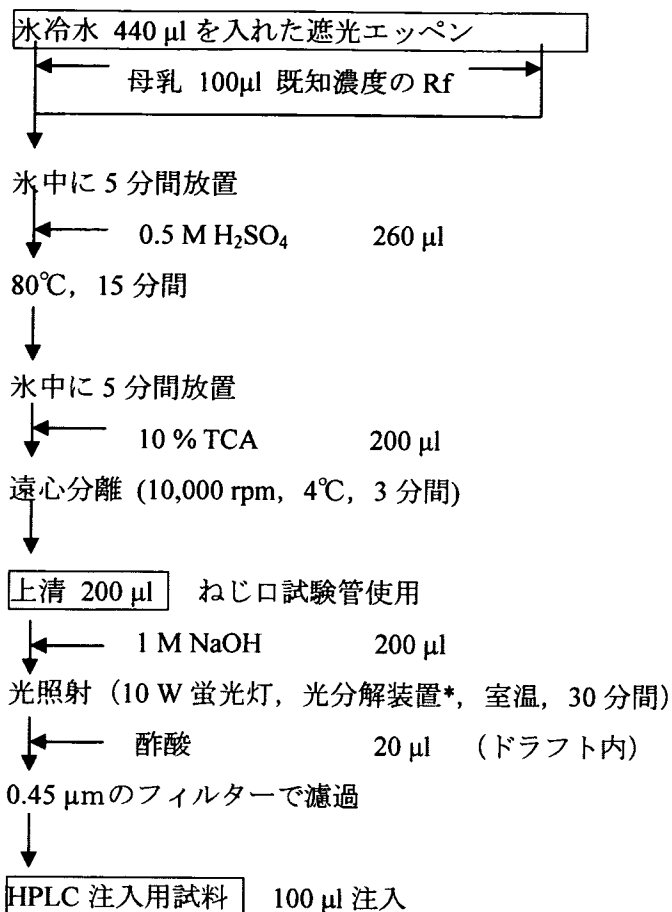


図 2 母乳中のビタミン B₂ の注入用試料の作成操作

* 光分解装置

乾固チューブ底の液面から 20 cm 離れた高さから, 蛍光灯の光が当たる木の箱 (縦 35 cm × 横 25 cm × 高さ 28 cm) の内面をすべてアルミ製のシールで覆い, 内部で蛍光灯の光が反射するようにした装置.

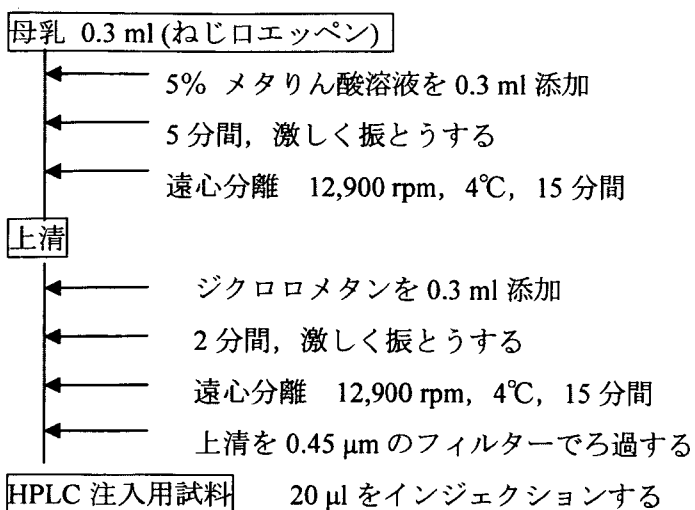


図 3-1 母乳中のビタミン B₆ の測定用試料溶液の作成操作

分析カラム	Tosoh ODS 80Ts (平均粒子直径, 5 μm ; 4.6 mm I.D. × 250 mm, 東ソー株式会社)
移動相流速	0.7 ml / min
反応液流速	0.1 ml / min
pressure	移動相 : 81 kg/cm ² , 反応液 : 6 kg/cm ²
検出波長	蛍光法, 励起波長 325 nm , 蛍光波長 425 nm
カラム温度	35°C
コイル温度	75°C
試料導入装置内温度	室温
試料注入量	20 μl
溶出時間	PLP : 9.7 min , PL : 8.7 min
終了時間	データープロセッサー : 15 min , オートインジェクター : 30 min
感度の設定	GAIN 1, SENS 2 (atten 6)

図 3-2 母乳中のビタミン B₆ の測定条件

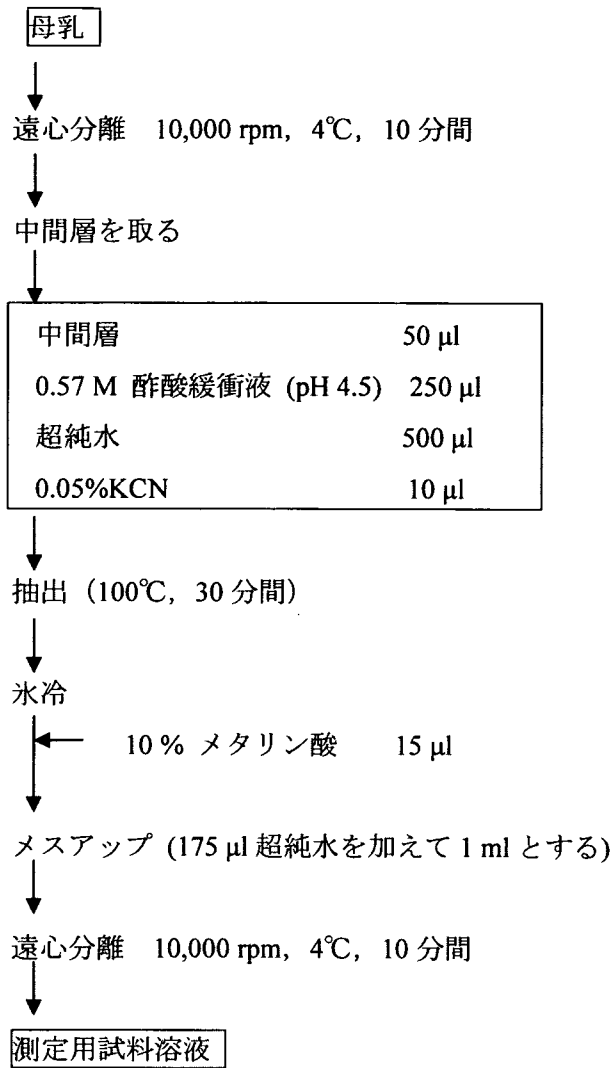


図 4 母乳中のビタミン B₁₂ の測定用試料溶液の作成操作

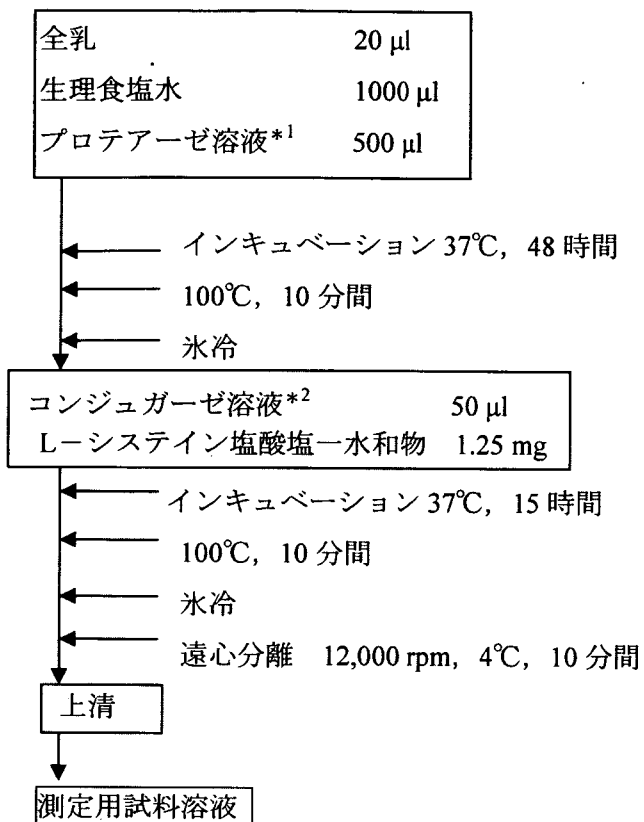


図 5. 葉酸測定用試料溶液の作成操作

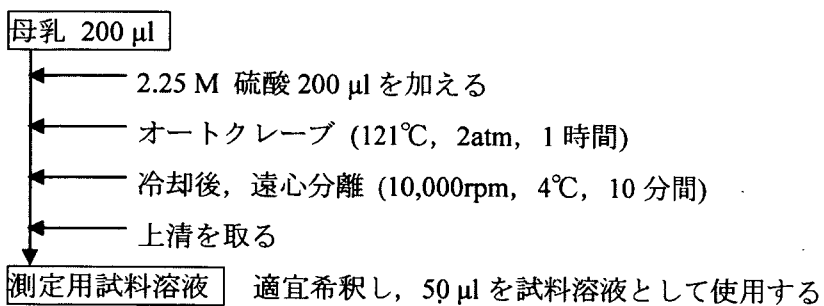


図 6 母乳中のビオチンの測定用試料溶液の作成操作

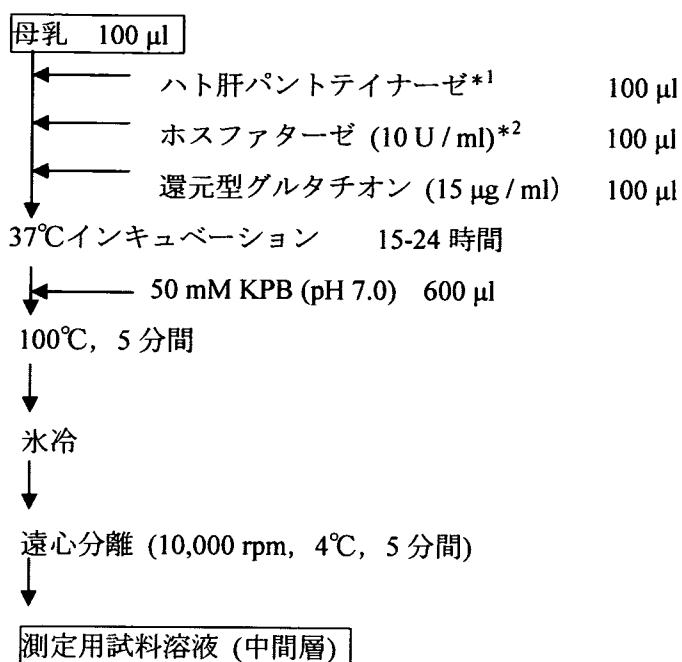


図 7-1 母乳中のパントテン酸の測定用試料溶液の作成操作

***1 ハト肝パントテイナーゼ**

(Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376, 10 g, -20°C)

作成方法を図 6-1 に示す。

***2 ホスファターゼ**

(Phosphatase, Alkaline from calf intestine, SIGMA P7923, 2000 units, 冷蔵)

- 1) 50 % glycerol, 1 ml を試薬容器に直接入れ静かに攪拌。(激しくすると泡立つ) →2000 U/ml
- 2) さらに 10 倍希釈 : 酵素 10 µl, 50 % glycerol 90 µl → 200 U/ml
- 3) さらに 20 倍希釈 : 酵素 20 µl, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.3) 380 µl → 10 U/ml

ハト肝パントテイナーゼ (冷凍保存)

ハト肝臓アセトンパウダー (Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376) 3 g を秤量瓶に入れる。

↓ 10 倍量の 50 mM KPB 30ml を入れる

静かに攪拌 (4°C, 30 分間 激しくすると泡立つ)

↓ 遠心分離 10,000 rpm, 4°C, 5 分間

上清を 100 倍量の 50 mM KPB (pH7.0) で 12 時間透析後, 緩衝液 (同量) を入れ替え, さらに

12 時間透析

↓ 遠心分離 10,000 rpm, 4°C, 5 分間

上清

図 7-2 ハト肝パントテイナーゼの調製方法

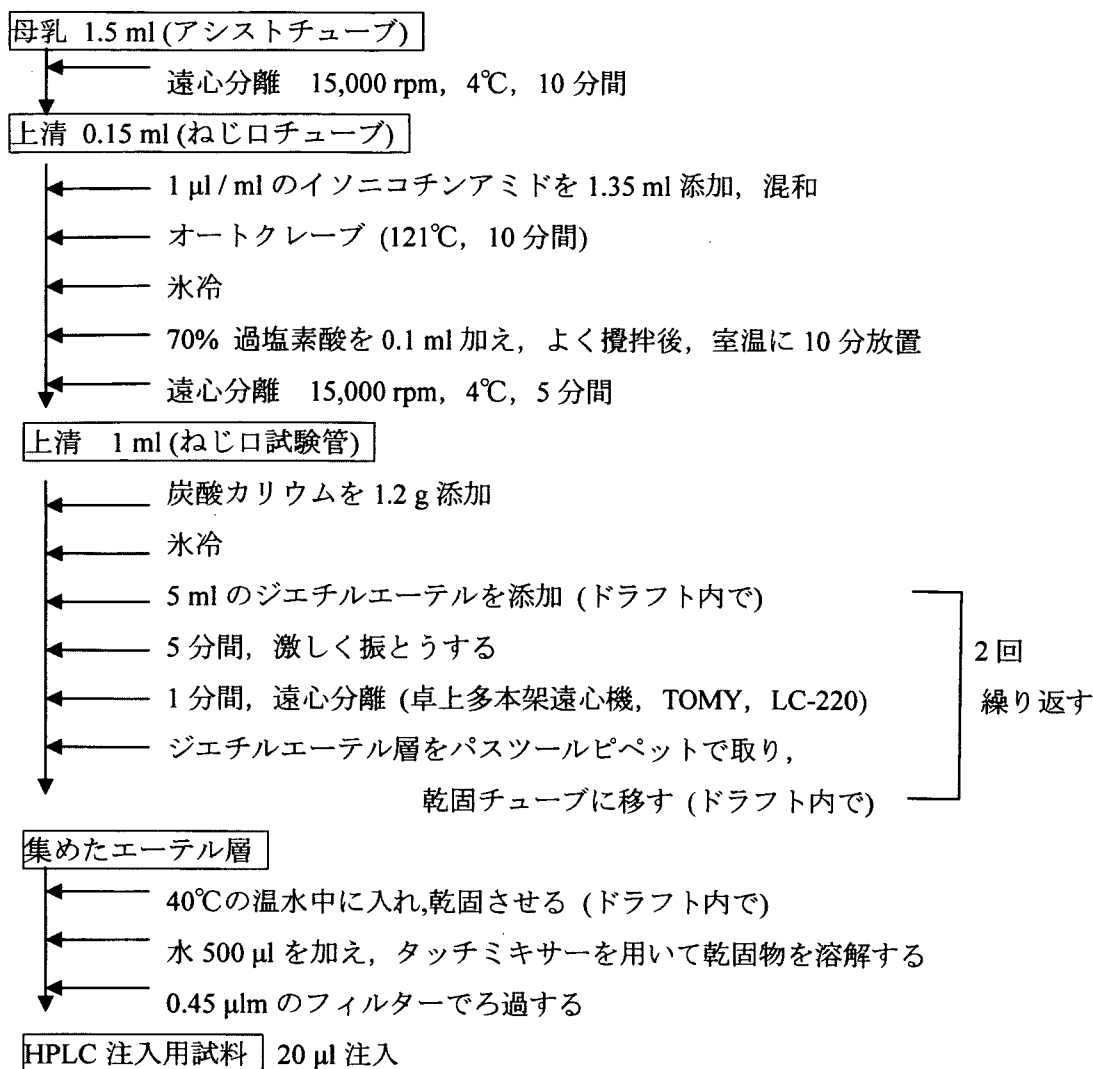


図 8 母乳中のナイアシンの注入用試料の作成方法

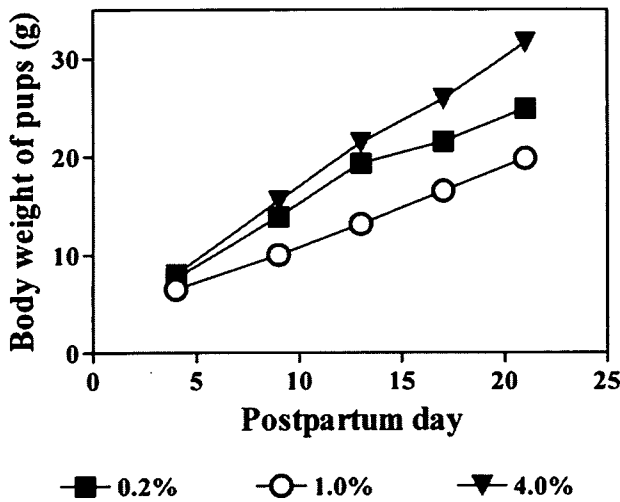


図9 ビタミン摂取量の違いが子ラットの成長に及ぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=3, 4, 5) として示した.

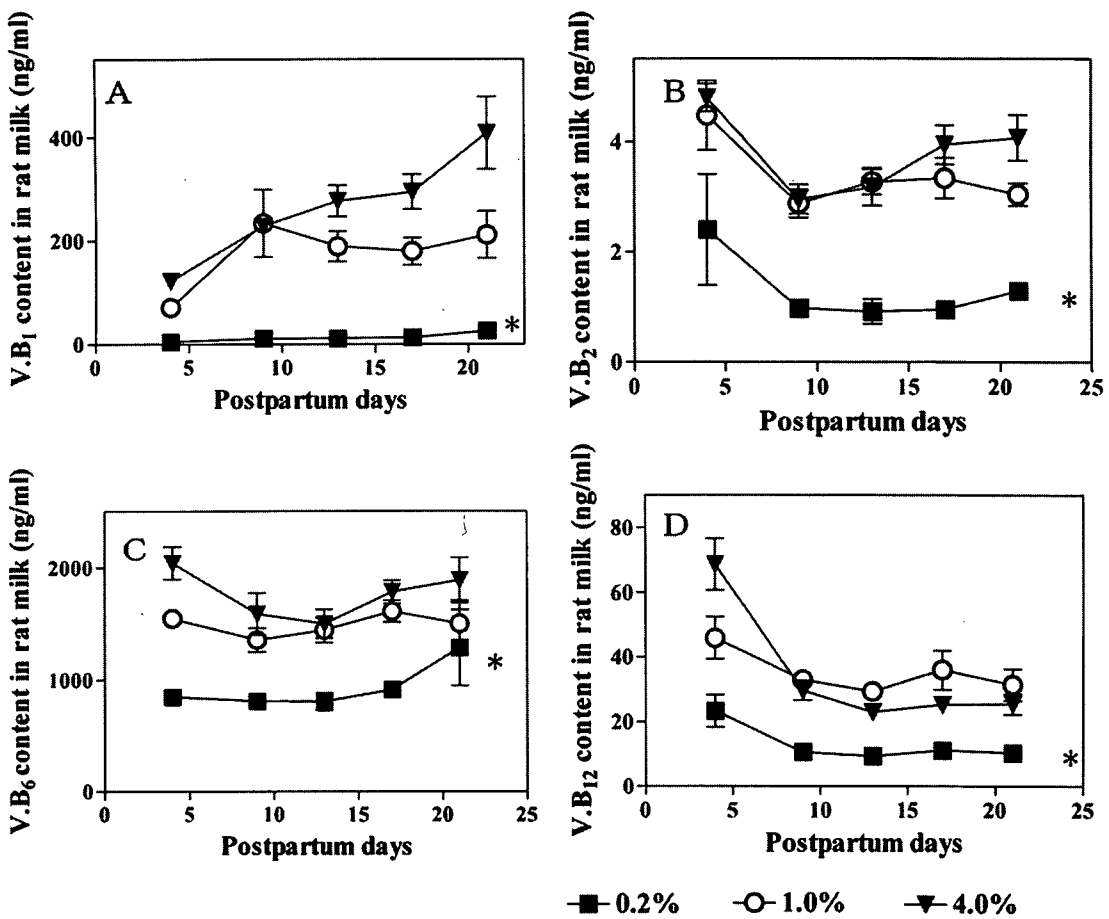
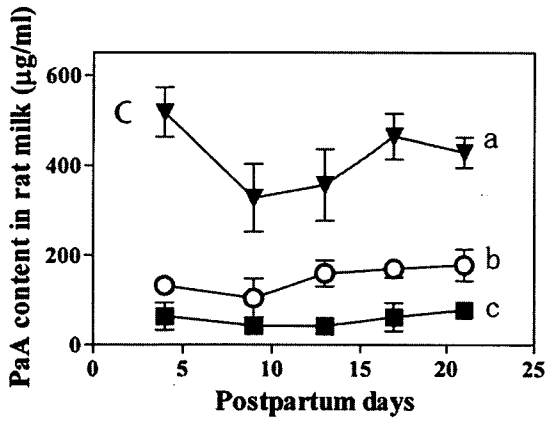
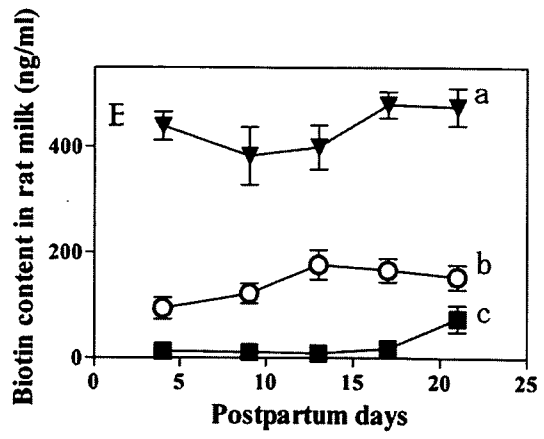
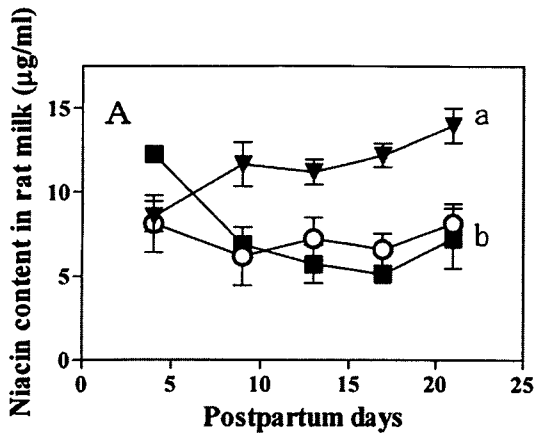


図10 ビタミン摂取量の違いがビタミン B₁ (A), ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ (C), ビタミン B₁₂ (D) の母乳中ビタミン濃度に及ぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=3, 4, 5) として示した. *は0.2%ビタミン混合食群が他の2群に比べて有意に低いことを表す.



■ 0.2% ○ 1.0% ▼ 4.0%

図 11 ビタミン摂取量の違いがナイアシン (A), ビオチン (B), パントテン酸 (C) の母乳中ビタミン濃度に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差 (n=3, 4, 5) として示した。異なる添え字は有意差を表す。

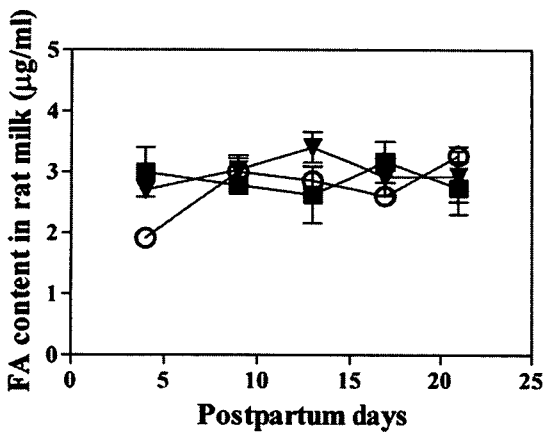


図 12 ビタミン摂取量の違いが葉酸の母乳中ビタミン濃度に及ぼす影響。値は平均値±標準誤差 (n=3, 4, 5) として示した。

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

15. ラットにおける水溶性ビタミンの摂取量と尿中排泄量，血中濃度，体内貯蔵量との関係

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究協力者 福渡 努 滋賀県立大学 助教

研究要旨

水溶性ビタミンの栄養状態を表すバイオマーカーとして尿中水溶性ビタミン排泄量および血中水溶性ビタミン濃度が利用されている。本研究では、これらのバイオマーカーをどのように有効に使用できるのかを明らかにすることを目的として、様々な量の B 群ビタミンを摂取させたラットにおける各バイオマーカーと体内貯蔵量との関係を調べた。3 週齢の Wistar 系雄ラットにナイアシン欠—AIN93 ビタミン混合食が 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0%となる 20%カゼイン食を与えて 4 週間飼育した。24 時間尿，血液および肝臓中の 8 種の B 群ビタミン量を測定した。0.1, 0.2% AIN93 ビタミン混合食により成長遅延が認められた。ビタミン B₁, B₂, B₆, パントテン酸，葉酸，ビオチンについて，肝 B 群ビタミン量と血中 B 群ビタミン濃度は摂取量依存的に増加し，0.2~0.5% AIN93 ビタミン混合食でプラトーに達した。血中 B 群ビタミン濃度と肝 B 群ビタミン量の変動は類似していた。尿中 B 群ビタミン排泄量も摂取量依存的に増大し，肝 B 群ビタミン量がプラトーに達すると排泄量は急激に増大した。ビタミン B₁₂ の尿中排泄量，血中濃度，肝貯蔵量は類似した変動を示し，いずれも摂取量依存的に増加し，0.5% AIN93 ビタミン混合食でプラトーに達した。以上の結果から，血中 B 群ビタミン濃度は肝 B 群ビタミン量を反映するため，欠乏の診断に有効なバイオマーカーとして利用できる可能性が示された。しかし，一定量以上の摂取により値が一定となるため，摂取量の評価には適さないことが考えられる。尿中 B 群ビタミン排泄量は体内貯蔵を反映しないため，欠乏の診断には適さないことが考えられる。しかし，摂取量依存的かつ直線的に増大し，摂取量との相関が非常に高いため，摂取量を評価するための有効なバイオマーカーとして利用できる可能性が示された。

A. 目的

水溶性ビタミンの栄養状態を評価するためのバイオマーカーとして、尿中排泄量と血中濃度がよく使われている。例えば、日本人の食事摂取基準 (2005 年版) において、ビタミン B₁ の推定平均必要量と推奨量はビタミン B₁ 摂取量と尿中チアミン排泄量の関係に基づいて策定され、ビタミン B₆ の推定平均必要量と推奨量は血漿ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 濃度を維持できるとしてビタミン B₆ 摂取量に基づいて策定された¹⁾。同様に、尿中排泄量に基づいて策定された水溶性ビタミンにはビタミン B₂ とナイアシン、血中濃度に基づいて策定されたビタミンにはビタミン B₁₂、葉酸、ビタミン C が挙げられる。平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究」²⁾および平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) の策定に関する基礎的研究」³⁾で行われたヒト介入試験によって、尿中水溶性ビタミン排泄量は摂取ビタミン量を反映することが明らかとなった。しかし、日本人の食事摂取基準 (2005 年版) に記載された推奨量前後の摂取量では、血中水溶性ビタミン濃度には変動は認められず³⁾、尿中水溶性ビタミン排泄量と血中水溶性ビタミン濃度、さらには水溶性ビタミン体内貯蔵量との関係は不明である。本研究では、水溶性ビタミンの摂取量と尿中排泄量、血中濃度、体内貯蔵量との関係を明らかにすることを目的として、幼若ラットにビタミン混合量の異なる飼料を与え、B 群ビタミンの尿中排泄量、血中濃度、体内貯蔵量におよぼす影響について調べた。

B. 実験方法

1. 動物飼育

本研究は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は 22°C 前後、湿度は 50% 前後、午前 6 時から午後 6 時までを明、午後 6 時から午前 6 時までを暗とした。3 週齢の Wistar 系雄ラットを日本クレア (株) より購入し、平均体重がほぼ等しくなるように 5 匹ずつ 6 群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。ナイアシン欠-AIN93 ビタミン混合がそれぞれ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0% 含む 20% カゼイン食を与え、28 日間飼育した。飼料と水は自由摂取とし、1 日ないし 2 日おきの午前 9 時から午前 10 時の間に新しいものと交換した。また、その際に体重と飼料摂取量を測定した。飼育最終日に 1 日尿を集めた。飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し、血液を採取し、肝臓を摘出した。尿、血液、肝臓は水溶性ビタミン量の測定に使用した。

2. 分析

血中総チアミン濃度は、チアミン、TMP、TDP、TTP の合計とした。全血にトリクロロ酢酸を加えて除タンパクし、HPLC による分析に供した⁴⁾。肝総チアミン量も同様にチアミン誘導体の合計とした。肝臓をトリクロロ酢酸中でホモジナイズし、HPLC による分析に供した。尿中チアミン量を測定するために、尿 9 mL に 1 M HCl を 1 mL 加えて安定化した。この尿を HPLC による分析に供した。

血中総リボフラビン濃度は、リボフラビン、FMN、FAD をルミフラビンに光分解し、ルミフラビン量を測定することにより総リボフラビン量とした。採血後、全血に水と硫酸を加えて加熱し、トリクロロ酢酸を加え、除タンパクした。アルカリ存在下で光照射し、これを HPLC による分析に供した⁵⁾。肝総リボ

フラビン量も同様に肝ホモジネート中のリボフラビン誘導体をルミフラビンに変換し、HPLCによる分析に供した。尿中リボフラビン量を測定するために、尿9 mLに1 M HClを1 mL加えて安定化した。この尿をHPLCによる分析に供した⁵⁾。

血漿PLP濃度を測定するために、血漿にメタリン酸を加えて除タンパクし、HPLCによる分析に供した⁶⁾。肝総ビタミンB₆量を測定するために、塩酸酸性下でホモジナイズした後、オートクレーブによりビタミンB₆ピタマーをピリドキシンに変換し、*Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080を用いた微生物定量法に供した⁷⁾。尿中4-ピリドキシン酸(4-PIC)量を測定するために、尿9 mLに1 M HClを1 mL加えて安定化した。この尿をHPLCによる分析に供した⁸⁾。

血漿ビタミンB₁₂濃度を求めるために、シアン化カリウム存在下で血漿中のビタミンB₁₂をシアノコバラミンに変換し、*Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830を用いた微生物学的定量法に供した⁹⁾。肝ビタミンB₁₂量の定量も同様に、シアン化カリウム存在下でホモジネート中のビタミンB₁₂をシアノコバラミンに変換し、微生物学的定量法に供した。尿中ビタミンB₁₂量の定量も同様に、シアノコバラミンに変換後、微生物学的定量法に供した。

血中総ニコチンアミド濃度を求めるために、全血にイソニコチンアミド溶液を加えてオートクレーブし、アルカリ中でエーテル抽出し、HPLCによる分析に供した¹⁰⁾。肝総ニコチンアミド量の定量も同様に、肝ホモジネート中の補酵素型ナイアシンをニコチンアミドに変換後、HPLCによってニコチンアミド量を測定した。尿中ニコチンアミド代謝産

物量はニコチンアミド、*N*¹-メチルニコチンアミド(MNA)、*N*¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)、*N*¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)の合計とした。尿中総ニコチンアミド代謝産物量を測定するために、尿9 mLに1 M HClを1 mL加えて安定化した。この尿をHPLC法に供し、尿中ニコチンアミド、2-Py、4-Py各含量を測定とした¹⁰⁾。また、尿中MNA含量をHPLC法で測定した¹¹⁾。

血漿総パントテン酸濃度を測定するために、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014を用いた微生物学的定量法に血漿を供した¹²⁾。肝総パントテン酸量を求めるために、摘出した肝臓を37°Cで7時間置き、自己消化によって結合型パントテン酸を遊離型にし、その肝のホモジネート中を微生物学的定量法に供した。尿中パントテン酸量を測定するために、尿を微生物学的定量法に供した¹²⁾。

血漿葉酸濃度を測定するために、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773を用いた微生物学的定量法に血漿を供した¹³⁾。肝葉酸量を測定するために、肝ホモジネートをコンジュガーゼとプロテアーゼで処理することによって葉酸をプテロイルモノグルタミン酸に変換し、微生物学的定量法に供した。尿中葉酸量を測定するために、尿9 mLに1 M アスコルビン酸溶液を1 mL加えて安定化し、同様に微生物学的定量法に供した¹³⁾。

血漿総ビオチン濃度を測定するために、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014を用いた微生物学的定量法に血漿を供した¹⁴⁾。肝総ビオチン量を求めるために、肝ホモジネートを微生物学的定量法に供した。尿中ビオチン量を測定するために、尿を微生物学的定量法に供した。

5. 統計処理

各週の比較には一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った。p 値が 0.05 以下のとき、統計的有意差があるものとした。計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 4 を使用した。

C. 結果

1. 飼料摂取量および体重増加量

実験動物では栄養素欠乏症として食欲減退とそれに伴う成長抑制が認められる。本研究では、標準飼料に用いられる 1.0% ビタミン混合食で飼育したラットに比べ、0.1% ビタミン混合食摂取ラットでは明らかな食欲減退と成長抑制が認められ、0.2% ビタミン混合食摂取ラットにおいても栄養素欠乏症である食欲減退と成長抑制が認められた (図 1)。すなわち、0.2% 以下のビタミン混合食摂取により、ビタミン欠乏症を発症した。

2. 尿中 B 群ビタミン排泄量

飼育 28 日目の 1 日尿に含まれる B 群ビタミンおよびその代謝産物量を測定した。尿中チアミン排泄量は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によってゆるやかに濃度依存的に増加し、1.0% ビタミン混合食摂取によって急激に増加した (図 2A)。

リボフラビンは 0.1~0.2% ビタミン混合食摂取ではほとんど全く尿中に排泄されなかったが、0.3% ビタミン混合食摂取によって尿中に排泄され、それ以上の濃度のビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加した (図 2B)。

尿中 4-PIC 排泄量は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によってゆるやかに濃度依存的に増加し、1.0% ビタミン混合食摂取によってさ

らに増加した (図 2C)。

尿中ビタミン B₁₂ 排泄量は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、それ以上の濃度のビタミン混合食摂取では増加はゆるやかになった (図 2D)。

尿中総ニコチンアミド排泄量は 0.1~0.3% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加したが、そこでプラトーに達した (図 2E)。

尿中パントテン酸排泄量は 0.1~0.4% ビタミン混合食摂取によってゆるやかに濃度依存的に増加し、それ以上の濃度のビタミン混合食摂取によって急激に増加した (図 2F)。

尿中葉酸排泄量は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によってゆるやかに濃度依存的に増加し、1.0% ビタミン混合食摂取によって急激に増加した (図 2G)。

尿中ビオチン排泄量は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によってゆるやかに濃度依存的に増加し、1.0% ビタミン混合食摂取によって急激に増加した (図 2H)。

3. 血中 B 群ビタミン濃度

飼育 28 日目の血中 B 群ビタミン濃度を測定した。血中総チアミン濃度は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、それ以上の濃度のビタミン混合食摂取では増加はゆるやかになった (図 3A)。

血中総リボフラビン濃度は 0.1~0.3% ビタミン混合食摂取では濃度依存的に増加したが、そこでプラトーに達し、0.4% 以上のビタミン混合食を摂取しても変動しなかった。(図 3B)。

血漿 PLP 濃度は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、そこでプラトーに達した (図 3C)。

血漿ビタミン B₁₂ 濃度は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、

そこでプラトーに達した (図 3D).

血中総ニコチンアミド濃度はビタミン混合食の濃度にかかわらず一定値を示した (図 3E).

血漿総パントテン酸濃度は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、そこでプラトーに達した (図 3F).

血漿葉酸濃度は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、そこでプラトーに達した (図 3G).

血漿総ビオチン濃度は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、そこでプラトーに達した (図 3H).

4. 肝 B 群ビタミン量

飼育 28 日目の肝 B 群ビタミン量を測定した. 肝総チアミン量は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、それ以上の濃度のビタミン混合食摂取では増加はゆるやかになった (図 4A).

肝総リボフラビン量は 0.1~0.3% ビタミン混合食摂取では濃度依存的に増加したが、そこでプラトーに達し、0.4% 以上のビタミン混合食を摂取しても変動しなかった (図 4B).

肝ビタミン B₆ 量は 0.1~0.2% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、そこでプラトーに達した (図 4C).

肝ビタミン B₁₂ 量は 0.1~0.2% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、そこでプラトーに達した (図 4D).

肝総ニコチンアミド量は 0.1~0.2% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、そこでプラトーに達した (図 4E).

肝総パントテン酸量はビタミン混合食摂取によって濃度依存的にゆるやかに増加した (図 4F).

肝葉酸量はビタミン混合食摂取によって

濃度依存的にゆるやかに増加した (図 4G).

肝総ビオチン量は 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し、そこでプラトーに達した (図 4H).

5. B 群ビタミン摂取量が尿, 血液, 肝臓中の B 群ビタミン量の相対的変動におよぼす影響

1.0% ビタミン混合食を摂取したラットの尿, 血液, 肝臓中の B 群ビタミン量をそれぞれ 100% としたとき, 各濃度のビタミン混合食摂取時の相対値を求め, 相対的変動をビタミン毎に図示した (図 5). ビタミン B₁ については, 血中総チアミン濃度と肝総チアミン量は類似した変動を示し, 0.1~0.5% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し, それ以上の濃度のビタミン混合食摂取では増加はゆるやかになった. 一方, 尿中チアミン排泄量は 0.5% 以上のビタミン混合食摂取によって急激に増加した. このように, 血中濃度と肝貯蔵量との変動が類似し, 血中濃度と肝貯蔵量がプラトーに達すると尿中排泄量が急激に増加するビタミンは, ビタミン B₂, 葉酸, ビオチンであった. ビタミン B₆ とパントテン酸については, まず肝貯蔵量がプラトーに達し, それ以上の濃度のビタミン混合食の摂取によって血中濃度が増加するが, やがて血中濃度もプラトーに達し, 血中濃度がプラトーに達すると同時に尿中排泄量が急激に増加した. ビタミン B₁₂ については, 血中濃度, 肝貯蔵量, 尿中排泄量の変動は類似していた. ナイアシンについては, 肝総ニコチンアミド量と尿中総ニコチンアミド代謝産物排泄量は 0.1~0.2% ビタミン混合食摂取によって濃度依存的に増加し, そこでプラトーに達したが, 血中総ニコチンアミド濃度は一定であった.

ビタミンB₁₂を除く7種のB群ビタミンでは、変動幅の最も大きい生体指標は尿中排泄量であった。血中濃度よりも肝貯蔵量の方が変動幅の大きいB群ビタミンは、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビオチンであった。血中濃度の方が肝貯蔵量よりも変動幅の大きいB群ビタミンは、ビタミンB₆とパントテン酸であった。ビタミンB₁₂と葉酸については、血中濃度の変動幅は肝貯蔵量の変動幅にほぼ等しかった。

D. 考察

本研究では、幼若ラットを用いてB群ビタミン摂取量の違いがB群ビタミンの尿中排泄量、血中濃度、肝貯蔵量におよぼす影響について調べた。ナイアシンを除き、ビタミン混合摂取量依存的に尿中排泄量、血中濃度、肝貯蔵量が増加した。血中濃度と肝貯蔵量は類似した変動を示し、摂取量依存的に増加するものの、ある一定量以上のビタミン混合食摂取によってプラトーに達する、あるいは増加がゆるやかになった。一方、尿中排泄量は血中濃度と肝貯蔵量とは異なる変動を示し、低濃度のビタミン混合食摂取では摂取量依存的ではあるが増加がゆるやかであり、ある一定量以上のビタミン混合食摂取によって排泄量が急激に増加した。

B群ビタミンの貯蔵部位は肝臓であるため、肝B群ビタミン量は体内貯蔵量を示している。血中B群ビタミン濃度の変動が肝B群ビタミン量と類似したパターンを示したという結果は、血中B群ビタミン濃度はB群ビタミン体内貯蔵量を反映するバイオマーカーとして利用できることを示している。本研究では、0.2%以下のAIN93ビタミン混合食では、ビタミン欠乏症である食欲減退とそれに伴

う成長抑制が認められた。すなわち、全てのビタミンについて必要量以上を摂取したのは0.3%以上のビタミン混合食を摂取したラットであった。従って、必要量前後のB群ビタミンを摂取しているとき、血中B群ビタミン濃度と肝B群ビタミン量は摂取量依存的に増加し、必要量を上回る量のB群ビタミンを摂取すると、飽和に達することが示された。これらのことから、血中B群ビタミン濃度は必要量前後のB群ビタミンを摂取しているとき、すなわちB群ビタミン欠乏を評価するための有効なバイオマーカーとして利用できる。

尿中B群ビタミン排泄量の変動は、ビタミンB₁₂を除き、血中B群ビタミン濃度および肝B群ビタミン量と異なる変動を示した。すなわち、必要量前後の摂取量では、摂取量依存的ではあるが、ゆるやかに増加し、摂取量が一定量以上になると急激に増加した。このことから、尿中B群ビタミン排泄量は必要量前後のB群ビタミンを摂取しているとき、すなわちB群ビタミン欠乏を調べるためのバイオマーカーとしての有効性には乏しい。しかし、必要量を上回る量のB群ビタミンを摂取しているときは、尿中B群ビタミン排泄量は摂取量依存的に増加するため、B群ビタミン摂取量を評価するための有効なバイオマーカーとして利用できる。

血中B群ビタミン濃度と肝B群ビタミン量の変動は類似しているが、飽和点に関して大きく2つのパターンに分けることができる。ビタミンB₁に代表されるように、血中B群ビタミン濃度の飽和点と肝B群ビタミン量の飽和点が同時に訪れるというB群ビタミンが存在する。ビタミンB₁以外に、ビタミンB₂、葉酸、ビオチンがこのパターンに該当

する。もう一つは、ビタミン B₆ に代表されるように、まず肝 B 群ビタミン量が飽和に達し、それ以上の量のビタミン混合摂取によって血中 B 群ビタミン濃度が飽和に達するというものである。これには、ビタミン B₆ のほかにパントテン酸が該当する。興味深いことに、血中 B 群ビタミン濃度の飽和と同時に尿中 B 群ビタミン排泄量が急激に増加した。これらの現象を説明するために、我々は以下に述べる機構を推察している。B 群ビタミン摂取量が必要量以下のとき、そもそも全身への供給に必要な B 群ビタミンを摂取できていないため、肝臓に貯蔵することも適わず、供給に必要な濃度を血液中に維持することもできないため、肝 B 群ビタミン量および血中 B 群ビタミン濃度は低い。腎臓での再吸収でほぼ全ての B 群ビタミンを回収できるため、尿中 B 群ビタミン排泄量は著しく低い。摂取量が必要量に達しているときは、供給に必要な量の B 群ビタミンを肝臓に貯え、供給に必要な濃度の B 群ビタミンを血液中に維持することができており、これらの値は必要量以下の摂取時に比べて改善される。改善されたとはいえ、依然として血中 B 群ビタミン濃度は低く、腎臓における回収率は高いため、尿中 B 群排泄量は若干増加する程度に留まる。必要量を上回る量の B 群ビタミンを摂取すると、全身に供給できる量以上の B 群ビタミンを摂取することから、肝貯蔵量は増加し、それに伴って血中 B 群ビタミン濃度も増加する。さらには、血中 B 群ビタミン濃度の増加に伴って腎臓における回収率が低下するため、尿中 B 群ビタミン排泄量も増加する。ある一定量以上の B 群ビタミンの摂取によって、肝臓への貯蔵は飽和し、肝 B 群ビタミン量は一定値を示す。肝臓に貯蔵しきれない

B 群ビタミンは血液中に留まることになるため、血中 B 群ビタミン濃度は増加する。しかし、腎臓における再吸収が飽和に達すると、一定量以上の B 群ビタミンを血液中に保持することができなくなるため、血中 B 群ビタミン濃度も飽和に達し、一定値を示す。再吸収できなかった B 群ビタミンは全て尿に排泄されるため、血中 B 群ビタミン濃度の飽和と同時に尿中 B 群ビタミン排泄量は急激に増加する。

ラットにおける B 群ビタミン必要量に関する報告はいくつかあり、ビタミン B₁ 必要量はチアミンとして 55 µg/100g 飼料¹⁵⁾、すなわち 0.11% ビタミン混合食に相当し、ビタミン B₆ 必要量はピリドキシリン塩酸塩として 45 µg/d¹⁶⁾、すなわち 0.21% ビタミン混合食に相当し、パントテン酸必要量はパントテン酸カルシウムとして 0.4 mg/100g 飼料³⁾、すなわち 0.25% ビタミン混合食に相当する。本研究では、0.2% ビタミン混合食摂取により何らかのビタミン含量が必要量以下であるために B 群ビタミン欠乏症を引起し、0.3% ビタミン混合食には全てのビタミンが必要量以上含まれるために最大成長が得られたことが示された。0.2% ビタミン混合食においてどのビタミンが必要量以下の量であるのかについては検討しなかったが、少なくともビタミン B₆ とパントテン酸がその可能性として挙げられる。

本研究において、食餌中のビタミン混合量が増加しても、尿中総ニコチンアミド排泄量、血中総ニコチンアミド濃度、肝総ニコチンアミド量は増加しなかった。その理由は、ナイアシン欠乏ビタミン混合をビタミン混合として用いたため、食餌中のビタミン混合量が増加しても、ナイアシン摂取量は 0 のままで