

A. 目的

パントテン酸は酸やアルカリに不安定で、パントテン酸の前駆体でもあるパントラクトンとβ-アラニンに加水分解される。このことから、胃酸によってパントテン酸が加水分解される可能性があるが、パントテン酸欠乏の発生は全く報告されていない。ヒトにパントテン酸欠乏食を10週間与えても、パントテン酸欠乏症の兆候すら表れることもない¹⁾。その理由の一つに、腸内細菌によってパントラクトンとβ-アラニンから合成されたパントテン酸を利用している可能性が挙げられる。しかし、腸内細菌が合成したパントテン酸がどの程度寄与しているのは明らかではない。本研究では、パントラクトンとβ-アラニンにパントテン酸活性があるかを明らかにすることを目的として、パントテン酸欠乏食にパントラクトンとβ-アラニンを添加した飼料を幼若ラットに与え、パントテン酸に関する栄養指標について調べた。

B. 実験方法

1. 動物飼育

本実験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20°C、湿度60%、午前6時～午後6時を明、午後6時～翌朝6時を暗とする明暗サイクルで行った。3週齢のWistar系雄ラットを日本クレア(株)より購入し、平均体重がほぼ均等になるように5匹ずつ3群に分けて、ラット用代謝ケージにいた。対照群にはパントテン酸欠乏20%カゼイン食にパントテン酸を0.00147% (67.1 μmol/kg 飼料) となるように添加した飼料を与え、欠乏群にはパントテン酸欠乏20%カゼイン食を与え、試

験群にはパントテン酸欠乏20%カゼイン食にパントラクトンとβ-アラニンをそれぞれ67.1 μmol/kg 飼料となるように添加した飼料を与え、28日間飼育した。飼料組成を表1に示した。飼料と水は自由摂取とし、1日ないし2日おきに新しいものに交換した。ラットの世話は午前8時から午前10時の間に行い、体重と飼料摂取量を測定した。実験最終日の1日尿と糞を集め、尿は塩酸酸性下で、糞はそのまま-20°Cで保存した。

実験最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し、採血を行い、肝臓、腎臓、肺、心臓、精巣、大脳、脾臓、胃を摘出した。尿中、肝臓中、血液中のチアミン、リボフラビン、B₆、ニコチンアミド代謝物、パントテン酸、葉酸、シアノコバラミン、ビオチンを測定した。糞中のパントテン酸量を測定した。

2. 分析

血中総チアミン濃度は、チアミン、TMP、TDP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²⁾。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。

3). 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³⁾.

血漿ピリドキサル 5'-リン酸 (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⁴⁾. 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 ビタミン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⁵⁾. 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⁶⁾.

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⁷⁾. 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⁸⁾. 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, N¹-メチルニコチンアミド (MNA), N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N¹-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⁸⁾. また, 尿中 MNA 含量を HPLC 法で測定した⁹⁾.

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, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に尿を供した¹⁰⁾. 糞中パントテン酸量を測定するために, 糞を 10 倍量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でホモジナイズし, その遠心上清を尿を微生物学的定量法に供した¹⁰⁾.

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¹¹⁾. 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¹¹⁾.

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^{12,13}).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。

3. 統計処理

各群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におよぼす影響

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、欠乏群には明らかな食欲減退と成長抑制が認められ、試験群の飼料摂取量と体重増加量は欠乏群と全く等しかった (図 1)。すなわち、パントラクトンと β -アラニンにはラットの成長に全く寄与しなかった。

2. 臓器重量におよぼす影響

脳、肺、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、胃、精巣の各重量を表 2 に示した。欠乏群におけるこれらの臓器重量は対照群より低値を示し、試験群の臓器重量は欠乏群の値と等しかった。

3. 肝臓、尿および糞中のパントテン酸量

飼育最終日の 1 日尿と 1 日糞、および肝臓に含まれるパントテン酸量を測定した。欠乏群では肝パントテン酸量が対照群より低値を示し、尿中パントテン酸排泄量も少

なかった (図 2)。試験群のパントテン酸量も欠乏群と同様に少なく、尿中排泄量も低下した。試験群の糞中のパントテン酸量は対象群より低値を示したが、欠乏群よりも高値を示した。

4. B 群ビタミン代謝におよぼす影響

リボフラビンと葉酸を除く 5 種の B 群ビタミンについて、欠乏群と試験群の尿中排泄量は対象群より低値を示した (表 3)。血中 B 群ビタミン濃度はパントテン酸欠乏およびパントラクトンと β -アラニン摂取による影響を受けなかった (表 4)。肝 B 群ビタミン量も同様にパントテン酸欠乏およびパントラクトンと β -アラニン摂取による影響を受けなかった (表 5)。

D. 考察

本研究では、パントテン酸前駆体であるパントラクトンと β -アラニンにパントテン酸活性があるかを明らかにすることを目的とし、ラットにパントラクトンと β -アラニンを添加した飼料を与えて 28 日間飼育し、パントテン酸前駆体のパントテン酸活性を検討した。パントテン酸前駆体の摂取によって、飼料摂取量、体重増加量、尿中および肝パントテン酸量に全く改善が認められなかったことから、パントテン酸前駆体にはパントテン酸活性はないことが明らかとなった。その一方で、パントテン酸前駆体を摂取したラットの糞中パントテン酸量は、パントテン酸欠乏ラットよりも高値を示した。これは、腸内細菌がパントテン酸前駆体からパントテン酸を合成していることを示唆している。しかし、パントテン酸前駆体にはパントテン酸活性は全く認められないことから、腸内細菌がパントテン酸を生

合成したとしても、パントテン酸栄養の改善には全く寄与しないことを示している。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 学会発表

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（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. The Coronary Drug Project Research Group. Clofibrate and niacin in coronary heart disease. *J Am Med Assoc* (1975) 231, 360-81.
2. 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.
3. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) 258, 5623-8.
4. Rybak ME, Pfeiffer CM. Clinical analysis of vitamin B₆: determination of pyridoxal

5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem* (2004) 333, 336-44.

5. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 17th ed., (2000) AOAC Inc, Arlington, VA, USA, 55-7.
6. Gregory JF 3rd, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) 32, 879-83.
7. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji 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* (1998) 46, 5177-80.
8. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5- carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4- carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
9. Shibata K. Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.
10. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.

11. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44, 361-70.
12. 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* (1994) 40, 491-8.
13. Wright LD, Skeggs HR. Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* (1944) 56, 95-98.

表1. 飼料組成

	対照群	欠乏群	試験群
カゼイン (g)	20	20	20
L-メチオニン (g)	0.2	0.2	0.2
α -コーンスターチ (g)	46.8984	46.9	46.898534
スクロース (g)	23.4	23.4	23.4
コーン油 (g)	5	5	5
ミネラル混合 (g)	3.5	3.5	3.5
パントテン酸欠-ビタミン混合 (g)	1.0	1.0	1.0
パントテン酸カルシウム (g)	0.0016	0	0
パントラクトン (g)	0	0	0.000593
β -アラニン (g)	0	0	0.000873

表2. パントラクトンと β -アラニンの摂取が臓器重量におよぼす影響

	対照群	欠乏群	試験群
大脳 (g)	1.26 \pm 0.02 ^a	1.16 \pm 0.02 ^b	1.18 \pm 0.01 ^b
肺 (g)	1.42 \pm 0.05 ^a	0.88 \pm 0.06 ^b	0.91 \pm 0.05 ^b
心臓 (g)	0.87 \pm 0.02 ^a	0.62 \pm 0.01 ^b	0.64 \pm 0.02 ^b
腎臓 (g)	1.81 \pm 0.02 ^a	1.58 \pm 0.03 ^b	1.47 \pm 0.05 ^b
肝臓 (g)	10.33 \pm 0.27 ^a	8.00 \pm 0.43 ^b	8.53 \pm 0.40 ^{ab}
脾臓 (g)	0.66 \pm 0.01 ^a	0.43 \pm 0.02 ^b	0.43 \pm 0.03 ^b
胃 (g)	1.13 \pm 0.03 ^a	0.84 \pm 0.04 ^b	0.87 \pm 0.03 ^b
精巣 (g)	2.32 \pm 0.08 ^a	2.06 \pm 0.06 ^b	2.03 \pm 0.06 ^b

値は平均値 \pm 標準誤差として示した。異なるアルファベットは有意差があることを示す。

表3. パントラクトンとβ-アラニンの摂取がB群ビタミン尿中排泄量におよぼす影響

	対照群	欠乏群	試験群
チアミン (nmol/day)	50.8 ± 7.5 ^a	17.0 ± 4.2 ^b	17.4 ± 1.7 ^b
リボフラビン (nmol/day)	120 ± 17	116 ± 107	103 ± 9
4-ピリドキシン酸 (nmol/day)	231 ± 12 ^a	182 ± 8 ^b	145 ± 9 ^b
シアノコバラミン (pmol/day)	20.2 ± 3.5 ^a	12.6 ± 1.0 ^b	11.2 ± 2.0 ^b
ニコチンアミド代謝産物 (μmol/day)	6.72 ± 0.87 ^a	3.89 ± 0.20 ^b	4.17 ± 0.37 ^b
葉酸 (nmol/day)	6.7 ± 0.9	7.2 ± 0.7	8.6 ± 0.8
ビオチン (nmol/day)	4.01 ± 0.49 ^a	1.85 ± 0.14 ^b	1.92 ± 0.23 ^b

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 5) として示した。異なるアルファベットは有意差があることを示す。

表4. パントラクトンとβ-アラニンの摂取が血中B群ビタミン濃度におよぼす影響

	対照群	欠乏群	試験群
全血チアミン (pmol/ml)	269 ± 15	257 ± 8	269 ± 16
全血リボフラビン (pmol/ml)	92.2 ± 18.2	133.3 ± 16.9	119.3 ± 8.4
血漿PLP (nmol/ml)	0.91 ± 0.15	1.11 ± 0.06	1.04 ± 0.08
血漿シアノコバラミン (pmol/ml)	3.12 ± 0.05	2.78 ± 0.08	2.82 ± 0.09
全血総ニコチンアミド (nmol/ml)	104 ± 15	94 ± 9	99 ± 13
血漿葉酸 (pmol/ml)	176 ± 11	155 ± 5	170 ± 3.3
血漿ビオチン (pmol/ml)	35.9 ± 2.4	33.3 ± 2.6	30.8 ± 2.3

値は平均値 ± 標準誤差 (n = 5) として示した。

表 5. パントラクトンと β -アラニンの摂取が肝 B 群ビタミン量におよぼす影響

	対照群	欠乏群	試験群
チアミン (nmol/g)	33.2 \pm 1.4	31.5 \pm 1.4	33.3 \pm 1.7
リボフラビン (nmol/g)	67.2 \pm 5.4	75.1 \pm 2.0	66.2 \pm 3.8
ビタミン B ₆ (nmol/g)	17.8 \pm 1.5	14.9 \pm 0.2	14.9 \pm 0.8
シアノコバラミン (pmol/g)	10.6 \pm 2.2	10.6 \pm 0.5	10.1 \pm 0.6
ニコチンアミド (μ mol/g)	1.31 \pm 0.07	1.30 \pm 0.10	1.30 \pm 0.11
葉酸 (nmol/g)	11.1 \pm 0.8	13.0 \pm 0.7	12.9 \pm 1.5
ビオチン (nmol/g)	1.51 \pm 0.03	1.49 \pm 0.06	1.33 \pm 0.07

値は平均値 \pm 標準誤差 (n = 5) として示した.

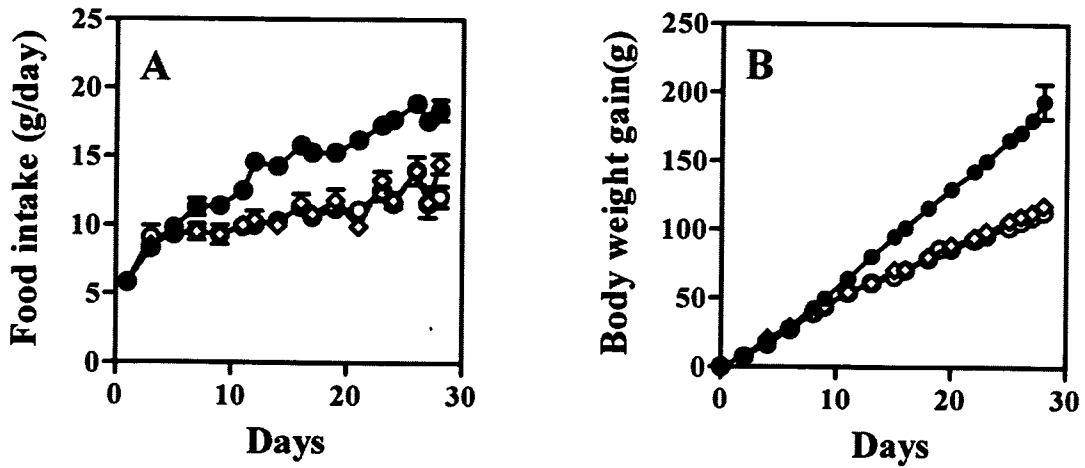


図1. パントラクトンと β -アラニンの摂取が飼料摂取量 (A) および体重増加量 (B) におよぼす影響. 対照群 (●), 欠乏群 (○), 試験食群 (◇) の値は平均値 \pm 標準誤差 (n=5) として示した.

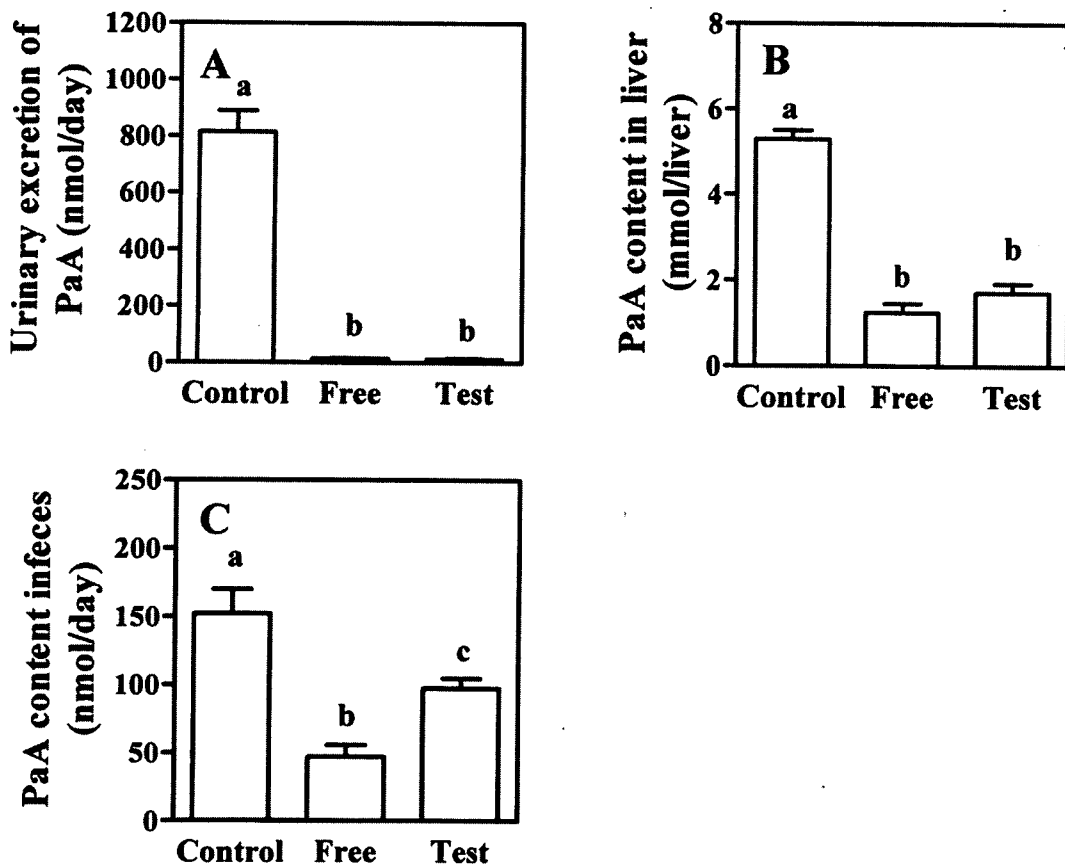


図2. パントラクトンと β -アラニンの摂取が尿中パントテン酸排泄量 (A), 肝臓パントテン酸量 (B), 糞中パントテン酸排泄量におよぼす影響 (C) におよぼす影響. 値は平均値 \pm 標準誤差 (n=5) として示した. 異なるアルファベットは有意差があることを示す.

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

18. 運動がビタミン B₁ 必要量におよぼす影響

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

ビタミン B₁ (VB₁) はエネルギー代謝に関与するため、日本人の食事摂取基準 (2005 年版) において推定平均必要量および推奨量は 1000 kcal 当りの値として策定された。しかし、実際にエネルギー消費量が増えると VB₁ 必要量も増加するという報告はない。本研究では、エネルギー消費量の増大が VB₁ 必要量を増加させるのかを明らかにすることを目的として、運動時における VB₁ 必要量の変動について調べた。VB₁ を必要量与えた Wistar 系雄ラットを疲労困憊に達する程度の強度で 1 日おきに泳がせた。水泳を行わなかったラットと比較して、肝臓、血液、尿中 VB₁ 量は低値を示した。一方、必要量の 6 倍の VB₁ を摂取させたラットでは、水泳による肝臓、血液、尿中 VB₁ 量の低下は認められなかった。これらの結果より、運動によって VB₁ 必要量が増加したことが示された。

A. 目的

ビタミン B₁ (VB₁) はエネルギー代謝に関与するビタミンである。日本人の食事摂取基準 (2005 年版) において、VB₁ の基準値は 1000 kcal あたりで示されている¹⁾。しかしこれはエネルギーあたりの摂取量を用いたメタアナリシスの結果と生化学的背景を根拠としたものである。チアミンの体内プールを飽和させると尿中へ排泄されるチアミン量が急激に増加することが知られており、メタアナリシスは 18 か国から報告された類似するデータを用いている。同様に食事摂取基準の基準値が 1000 kcal あたりで示されているものの 1 つにナイアシンがある。ナイアシンの補酵素である NAD はエネルギー産生に大きく関与している。血中 NAD 濃度が運動によってどう変化するかを調べた実験はいくつかある^{2,3)}。ラットに水泳をさせた群では非水泳群に比べ血中 NAD 濃度は減少し、運動前にニコチンアミドを投与すると血中 NAD 濃度に変化はみられなかった²⁾。食事を規定しないヒトにハーフマラソンをさせた実験では運動前後で血中 NAD 濃度が増加した³⁾。ナイアシンの補酵素型である NAD の血中濃度と運動に関する結果は一致していない。VB₁ について、運動選手の VB₁ 必要量についての報告はあるものの、摂取した VB₁ 量は運動選手にも適切な量かどうかを調べる実験であり、一定の見解は出ていない^{4,5)}。本研究では、エネルギー消費量が増加すると VB₁ 必要量も増加するかを検討するため、ラットに水泳をさせることで VB₁ 必要量が増加するかを調べた。

B. 実験方法

1. 動物飼育

本実験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～午後 6 時を明、午後 6 時～午前 6 時を暗とした。

3 週齢の Wistar 系雄ラットを日本クレア (株) より 26 匹購入し、平均体重がほぼ等しくなるように 2 群 (n=13) に分け、ラット用代謝ケージに入れた。飼料は 20% カゼイン食とし、飼料 100 g 中にチアミン塩酸塩が 0.1 mg、0.6 mg となるように調製し、それぞれの群に与え (それぞれを 0.1 mg 群、0.6 mg 群とする) 予備飼育として、14 日間飼育した。その後それぞれの群で平均体重と水泳の習熟度がほぼ等しくなるように水泳群と、非水泳群にわけ、さらに 18 日間飼育した。0.1 mg の飼料摂取かつ水泳あり群を 0.1 mg 水泳群、水泳なし群を 0.1 mg 非水泳群とし、同様に 0.6 mg 飼料摂取かつ水泳あり群を 0.6 mg 水泳群、水泳なし群を 0.6 mg 非水泳群とした。水泳は 1 日おきに、ラットが疲労困憊になり 30 分泳ぎきる程度の流速 (7~8 l/min) とおもり (体重の 0~4%) で泳がせた²⁾。飼料と水は自由摂取とし、1 日ないし 2 日に 1 回新しいものと交換した。世話の時間は午前 9 時～午前 11 時とし、体重と飼料摂取量を測定した。飼育最終日その前日 (水泳実施日と非実施日) の各 1 日尿 (午前 10 時～翌日午前 10 時: 24 時間) を塩酸酸性下で集めた。採尿後、尿は -20°C で保存した。

飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し、血液を採取した。肝臓を摘出し、重量を測定した。肝臓、全血中 VB₁ 量および尿中 VB₁ 排泄量を測定した。

2. 分析

①尿中 VB₁

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のチ

アミンは木村らの HPLC 法⁶⁾を改変した福渡らの方法⁷⁾に従って測定した。詳細は II-21. に記載した。

②血中 VB₁

血中 VB₁ 含量の測定として、EDTA-4Na を 0.4 mg 入れた 1.5 ml チューブに採取した血液 150 μ l を加えてよく混合し、さらに 5% TCA を 300 μ l 加えてよく混合した。遠心後上清を試料とした。HPLC インジェクション量は 100 μ l とした。詳細は II-21. に記載した。

③肝臓中 VB₁

肝臓中 VB₁ 含量の測定として、肝臓 0.5 g に 10 倍量の 5% TCA を加えてホモジナイズし、遠心後上清を試料とした。詳細は II-21. に記載した。

3. 統計処理

数値は平均 \pm 標準誤差 (SEM) で表した。有意差検定には GraphPad Prism (version 4 : GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。検定は *t*-test (unpaired *t*-test) により、飼料ごとの水泳群 - 非水泳群間で有意差をみた。

C. 結果

1. 運動が飼料摂取量および体重増加量におよぼす影響

VB₁ の栄養状態を示す指標として、飼料摂取量の低下とそれに伴う体重増加量の抑制が挙げられる。本研究では、Wistar 系雄ラットに飼料 100 g 中 0.1 mg, 0.6 mg のチアミン塩酸塩を含む食事を与え、15 日目から水泳群に水泳させ、合計 32 日間飼育した。この飼育期間の飼料摂取量および体重増加量は運動による影響が認められなかった (図 1, 2)。

2. 運動が肝臓重量におよぼす影響

飼育最終日に肝臓を摘出し、肝臓重量を測

定した。肝臓重量は運動の影響が認められなかった (図 3)。

3. 運動が尿中 VB₁ 排泄量におよぼす影響

飼育最終日とその前日の各尿に含まれる VB₁ 量を測定し、その平均を尿中 VB₁ 量とした (図 4)。尿中 VB₁ 排泄量は飼料摂取量依存的に増加し、0.6 mg 群の値は 0.1 mg 群の約 30 倍を示した。0.6 mg 群の非水泳群と水泳群の間に差異は認められなかった。0.1 mg 群では非水泳群に比べ、水泳群で低値を示した。

4. 運動が血液および肝臓中 VB₁ 濃度におよぼす影響

飼育最終日の血液および肝臓に含まれる VB₁ 濃度を測定した。血液中 VB₁ 濃度は飼料摂取量依存的に増加し、0.6 mg 群の値は 0.1 mg 群の約 4 倍を示した (図 5)。肝臓中 VB₁ 濃度も同様に飼料摂取量依存的に増加し、0.6 mg 群の値は 0.1 mg 群の約 5 倍を示した (図 6)。血液および肝臓中の VB₁ 濃度ともに 0.6 mg 群の非水泳群と水泳群の間に差異は認められず、0.1 mg 群では水泳群は非水泳群に比べて低値を示した。

D. 考察

本研究でエネルギー消費量の増加が VB₁ 必要量を増加させるかどうか検討した。エネルギー消費量を増加させるため、ラットに水泳をさせた。これはラットが疲労困憊になるまで運動させるときに“疲労困憊”の基準を客観的に判断しやすいためである。飼料に含まれるチアミン塩酸塩 0.1 mg/100 g という量は、本研究室が明らかにしたラットにおける VB₁ の必要量である。飼料摂取量、体重増加量および肝臓重量は VB₁ 欠乏状態を、尿中 VB₁ 排泄量は VB₁ 代謝状態を、血液および肝臓中 VB₁ 濃度は VB₁ 蓄積量をそれぞれ示す指標で

ある。

ラットの肝臓、血液中のVB₁濃度において、0.6 mg群に比べ0.1 mg群が低値を示しており、尿中のVB₁排泄量が0.1 mg群でほとんどなかった。しかし0.1 mgと0.6 mgの非水泳群において両群間で飼料摂取量、体重増加量、肝臓重量に差がみられなかったため、欠乏状態でなかったことが考えられる。肝臓、血液それぞれで0.6 mg群のB₁濃度が0.1 mg群の4~5倍であった。また尿中VB₁排泄量は0.6 mg群が0.1 mg群の30倍であった。これらのことからラットは肝臓にVB₁を十分量蓄えていると考えられる。そして蓄積容量よりさらに過剰な分が尿中に排泄される。尿中VB₁排泄量、血液および肝臓中VB₁濃度において、0.6 mgの非水泳群と水泳群の間に差異は認められず、0.1 mgで非水泳群に比べ、水泳群が低値を示した。これは運動によってVB₁の必要量が高まり、飼料ではVB₁賄いきれなくなり、はじめに尿へ排泄する量を減らした。それでもVB₁が不足すると、肝臓に蓄えていたVB₁を利用し、肝臓に貯蓄したVB₁も減少したために血液が減少したと考えられると考えられる。この状態が長期間続けば、VB₁が不足し、体重増加が抑制され、肝臓重量も減少すると考えられる。

またヒトの実験^{2,3)}で一定の見解が出ていないのは、ヒトを対象にした実験では必要量を個々に設定するのは困難であり、十分量のVB₁を摂取していたことが原因だと考えられる。本研究の0.6 mg群、つまりVB₁を必要量の数倍摂取した場合、水泳群は非水泳群と比較して尿中排泄量と肝臓中濃度に有意な差はなかった。これと同じように、ヒトでは必要量の数倍VB₁を摂取していたために運動を行っても差が出る場合と出ない場合の

両方が起ったと考えられる。

したがって、本研究はVB₁を必要量だけ摂取させることにより、エネルギー消費量が増加するとVB₁の必要量も増加するということを明らかにした。この結果より、食事摂取基準でVB₁の必要量がエネルギーあたりで示されていることは妥当であると証明された。

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（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. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準(2005年版), 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書. 東京, 2004.

2. 柴田克己, 松本圭太郎, 伏木亨, 杉本悦郎. 運動がNAD代謝に及ぼす影響. ビタミン(1994) 68, 75-81.

3. 米倉麗子, 伊藤康宏, 柴田克己, 福渡努, 斉藤邦明, 小栗誼人, 朝山正己, 長村洋

- 一. 走行運動負荷が Trp-NAD 経路に及ぼす影響. *健康創造研究* (2002) 1, 57-64.
4. 山田哲雄, 高橋徹三, 村松成司. ビタミン B₁, B₂, C 代謝に及ぼす運動の一過性の影響. *体力科学* (1986) 35, 364.
5. 小林修平, 山川喜久江. ボート選手の栄養状態: B₁ 及び B₂ の摂取レベルと血液生化学的栄養状態評価. *体力科学* (1986) 35, 367.
6. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. Liquid chromatographic determination of total thiamin content of blood. *Clin Chem* (1982) 28, 29-31.
7. 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. *食衛誌* (2004) 45, 231-238.

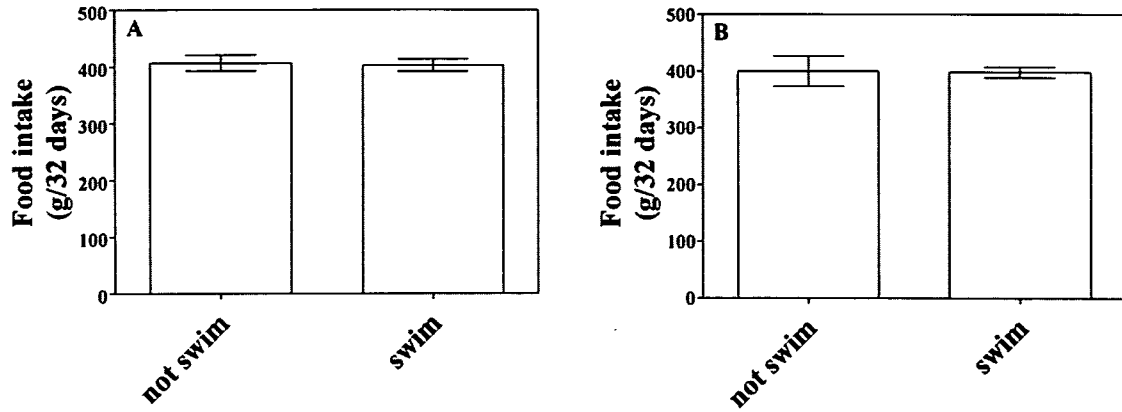


図1. 運動が飼料摂取量におよぼす影響. 0.6 mg 群 (A) および 0.1 mg 群 (B). 値は平均値 ± 標準誤差として示した.

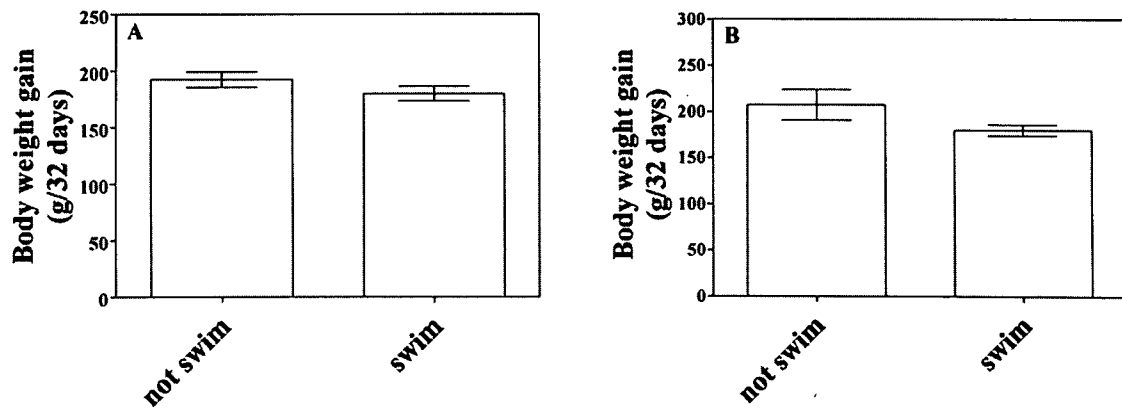


図2. 運動が体重増加量におよぼす影響. 0.6 mg 群 (A) および 0.1 mg 群 (B). 値は平均値 ± 標準誤差として示した.

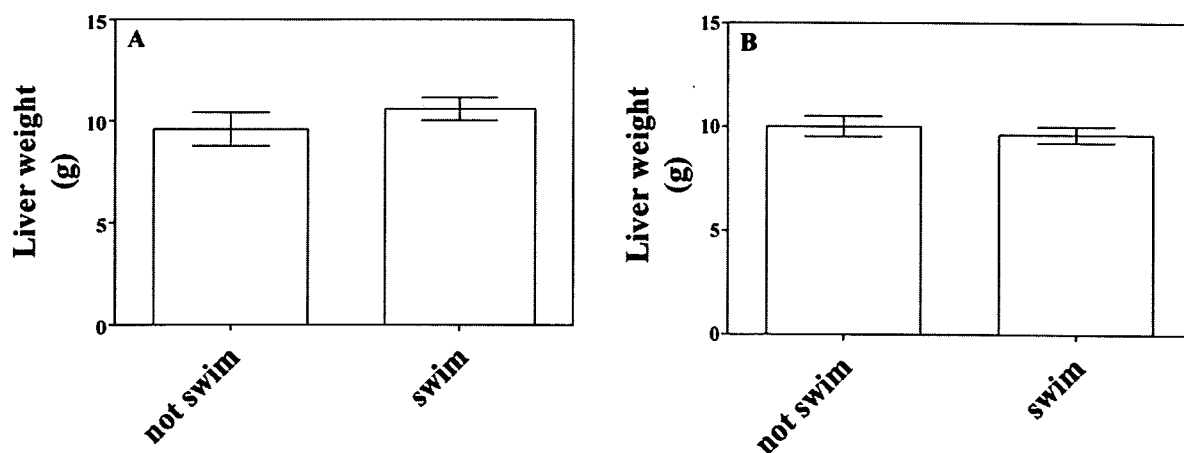


図3. 運動が肝臓重量におよぼす影響. 0.6 mg 群 (A) および0.1 mg 群 (B). 値は平均値 ± 標準誤差として示した.

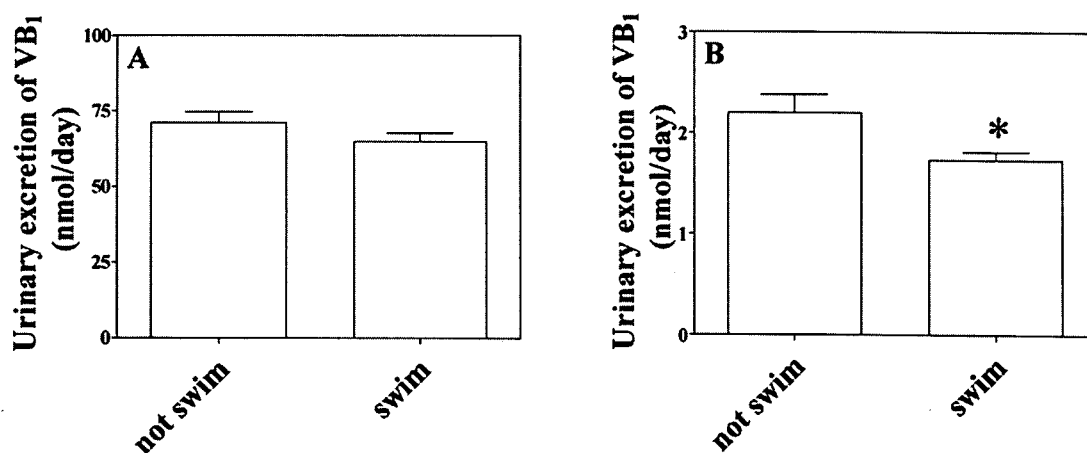


図4. 運動が尿中 VB₁ 排泄量におよぼす影響. 0.6 mg 群 (A) および0.1 mg 群 (B). 値は平均値 ± 標準誤差として示した. *は水泳群と非水泳群の間に有意差があることを示す ($p < 0.05$).

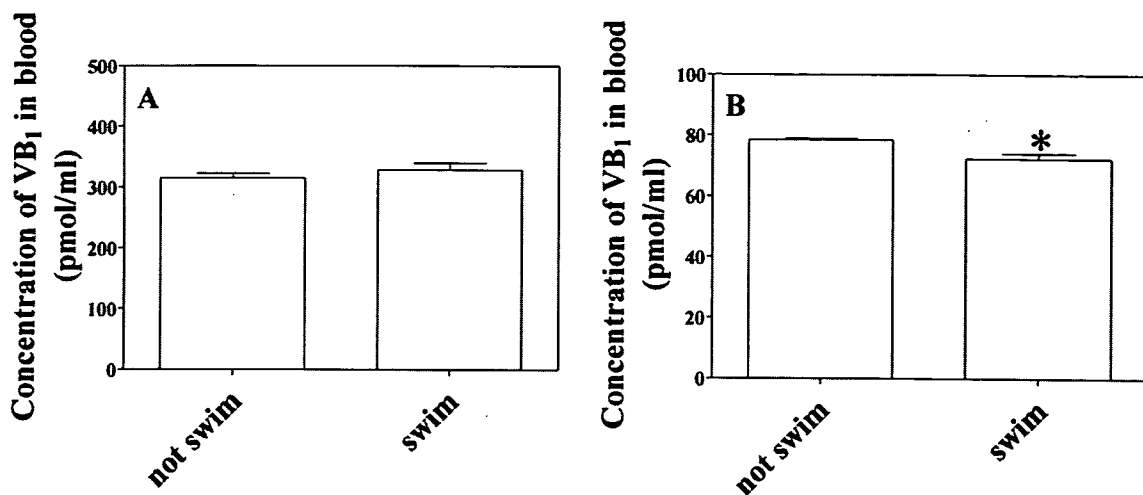


図5. 運動が血液中 VB₁ 量におよぼす影響. 0.6 mg 群 (A) および 0.1 mg 群 (B). 値は平均値 ± 標準誤差として示した. *は水泳群と非水泳群の間に有意差があることを示す ($p < 0.01$).

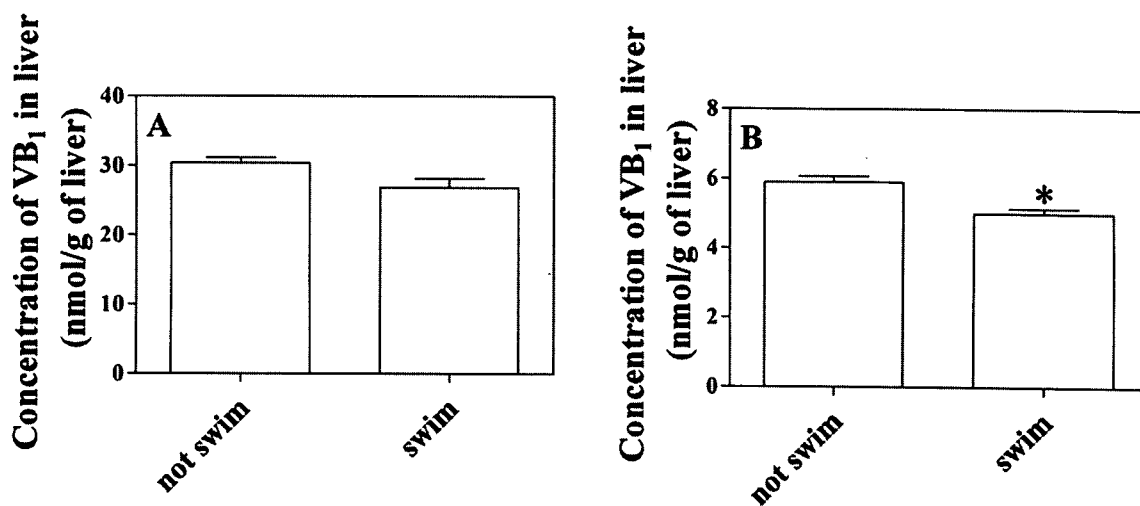


図6. 運動が肝臓中 VB₁ 量におよぼす影響. 0.6 mg 群 (A) および 0.1 mg 群 (B). 値は平均値 ± 標準誤差として示した. *は水泳群と非水泳群の間に有意差があることを示す ($p < 0.01$).

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

19. グルコース摂取の必須性

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

脳、神経組織、赤血球、腎尿細管、精巣、酸素不足の骨格筋などではエネルギー源として、通常グルコースしか利用できない。本研究室が以前に行った実験では、低炭水化物食（29.9%スクロース）ではラットへの成長に影響は見られなかった。そこで今回、以前の研究によりもさらにそこからグルコースを制限することで幼若ラットにどのような影響があるかを調べ、グルコース摂取の必須性を検討した。3週齢のラットに、グルコース・フルクトース比の異なる飼料を与えて21日間飼育した。その結果、体重増加量、飼料摂取量、臓器重量において各群間に差はなかった。血清中・尿中成分値においても、グルコース制限の影響はなかった。グルコースを全く摂取しなかった群でも血清および尿中に、成長するのに十分なグルコースが存在しており、成長抑制も起こさなかったことから、本研究ではグルコース摂取の必須性はないことが示された。

A. 目的

栄養素の中ではエネルギー源として、糖質、タンパク質、脂質が利用されるが、脳や神経組織、赤血球、腎尿細管、精巣、酸素不足の骨格筋などにおいては、通常、グルコースしかエネルギー源として利用できない。グルコースの供給がなくなり、血中のグルコースが不足すると、糖新生によって糖原生アミノ酸やフルクトースからグルコースが供給される。しかし、これはエネルギー効率が悪く、糖新生の場である肝臓の疲弊も考えられる。このことから、グルコース摂取は重要と考えられる。

日本人の食事摂取基準 (2005 年版) において、炭水化物はエネルギー%で目標量のみ定められている。この目標量は、グルコースをエネルギー源として利用する体内組織のグルコース要求量の推定値と、タンパク質と脂質の目標量とを考慮して出されたもの¹⁾であり、直接的な糖質供給量による生体反応をみたものではない。

過去のラットを用いた研究において、通常タンパク食 (20%カゼイン食) 糖質の割合を減らした高タンパク食 (40%カゼイン食) では、それぞれ炭水化物源を小麦デンプンとしたものと、グルコース含量が半分のスクロースとしたもので、ラットの成長に差は見られなかったことが報告されている²⁾。また、別の研究では、60%カゼイン食で炭水化物源を全てスクロースにしたものも成長に影響がなかったと報告されている³⁾。

以上のように、グルコース摂取の重要性は示唆されているものの、実験による科学

的根拠は示されていない。そこで、本研究ではグルコース摂取の必須性を考えることを目的として、グルコースの制限がラットにおよぼす影響を調べた。

B. 実験方法

1. 動物飼育

本実験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～午後 6 時を明、午後 6 時～午前 6 時を暗とした。3 週齢の Wistar 系雄ラット 26 匹を日本クレア (株) より購入し、平均体重がほぼ等しくなるように 5～6 匹ずつ 5 群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。飼料組成は 60%カゼイン食、ナイアシンフリービタミンミックスを使い、糖質 29.9% で、糖質内容が全てスクロースのものグルコース:フルコースを 1:1, 1:2, 1:4, 0:1 とし (それぞれの群をスクロース群, G:F=1:1 群, 1:2 群, 1:4 群, 0:1 群とした) 21 日間飼育した飼料の組成を表 1 に示した。飼料と水は自由摂取とし、1～2 日ごとに午前 9 時～10 時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。飼育最終日の尿 (午前 9 時～翌日午前 9 時: 24 時間) 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、脳、肝臓、腎臓、精巣を摘出し、各臓器重量を測定した。血液は血清中グルコース、総タンパク、尿酸、クレアチニン、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、トリグリセリド、の測定に使用した。尿はグルコース、クレアチニン、チアミン、リボフラビン、4-ピリドキシニン酸 (ビタミン

B6 代謝産物), シアノコバラミン, ニコチンアミド異化代謝産物, パントテン酸, ビオチン, 葉酸, の測定に使用した.

2. 分析

1-1. 血清中, 尿中成分の測定方法

血清, 尿はそのまま測定用試料とした. 血清中グルコース, 総タンパク, 尿酸, クレアチニン, ALT, トリグリセリド, 尿中グルコース, クレアチニンは富士ドライケム 3500i を使用し測定した. それぞれのキットでの測定方法を下に示す. グルコース (GOD・POD/4AA 法), クレアチニン (クレアチニンディミナーゼ/ BPB 指示薬法), 総タンパク (ビウレット法), トリグリセリド (グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ/ロイコ色素法), 尿酸 (ウリカーゼ・POD/ロイコ色素法), ALT (GOD・POD/4AA 法).

1-2. 尿中水溶性ビタミンの測定方法

① ビタミン B₁

尿をそのまま測定用試料とした. 尿中のチアミンは木村らによる HPLC 法⁴⁾ を改変した福渡らの方法⁵⁾ に従って測定した. 詳細は II-21. に記載した.

② ビタミン B₂

尿をそのまま測定用試料とした. 尿中のリボフラビン HPLC 法に従って測定した⁶⁾. 詳細は II-21. に記載した.

③ ビタミン B₆

尿をそのまま測定用試料とした. ビタミン B₆ の異化代謝産物である 4-ピリドキシン酸の尿中排泄量の測定は HPLC で測定した

⁷⁾. 詳細は II-21. に記載した.

④ ビタミン B₁₂

尿は前処理を行い, 測定用試料とした. 尿中のビタミン B₁₂ は *Lactobacillus leichimannii* ATCC 7830 (American Type Culture Collection, USA) を用いた微生物学的定量法にて⁸⁾. 詳細は II-21. に記載した.

⑤ ナイアシン

尿をそのまま測定用試料とした. 尿中ニコチンアミド, ニコチンアミドの異化代謝産物である N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) は柴田らによる HPLC 法に従って測定した⁹⁾. 尿中 N¹-メチルニコチンアミド (MNA) は柴田らによる方法に従って測定した¹⁰⁾. 詳細は II-21. に記載した.

⑥ パントテン酸

尿をそのまま測定用試料とした. 尿中のパントテン酸は乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法にて測定した¹¹⁾. 詳細は II-21. に記載した.

⑦ ビオチン

ビオチンは 800×g, 5 分間遠心した上清を測定用試料とした. 尿中のビオチンは, 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法を用いて測定した^{12,13)}. 詳細は II-21. に記載した.

⑧ 葉酸

尿をアスコルビン酸処理したものを測定用試料とした. 尿中の葉酸は乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC 27773 を用いた微