

表3 飼料中のニコチン酸欠-ビタミン混合含量の違いが尿中へのトリプトファンの異化代謝におよぼす影響

	飼料摂取量 ¹ (g/日)	Trp 摂取量 ¹ (μ mol/日)	AnA 排泄量 (nmol/日)	AnA 排泄率 ² (%)	KA 排泄量 (nmol/日)	KA 排泄率 ² (%)	XA 排泄量 (nmol/日)	XA 排泄率 ² (%)
健常ラット×0.3% VX	20.4±0.4	232±5	98±4	0.045±0.002	976±66	0.432±0.036	984±76	0.424±0.043
健常ラット×0.5% VX	20.9±0.5	237±5	91±9	0.038±0.003	1017±151	0.426±0.053	886±113	0.373±0.042
健常ラット×1.0% VX	21.0±0.6	239±6	103±9	0.043±0.004	1107±108	0.465±0.045	1003±76	0.420±0.029
糖尿ラット×調整 0.3% VX	42.3±1.4*	462±32*	121±21	0.025±0.004*	1195±288	0.259±0.062*	893±186	0.193±0.040*
糖尿ラット×調整 0.5% VX	44.3±2.1*	502±24*	122±22	0.024±0.006	1207±244	0.237±0.041*	948±425	0.189±0.074*
糖尿ラット×調整 1.0% VX	41.3±1.4*	475±13*	124±35	0.027±0.008	1244±124	0.258±0.029*	848±167	0.179±0.031*
2-way ANOVA <i>p</i> -values								
ストレプトゾトシン	<0.001	<0.001	0.1332	<0.001	0.230	<0.001	0.725	<0.001
ビタミン含量	0.455	0.452	0.939	0.648	0.878	0.807	0.995	0.829
ストレプトゾトシン× ビタミン含量	0.464	0.575	0.965	0.826	0.974	0.933	0.871	0.802

各値は平均値±標準誤差 ($n=5$) で示した。*健常ラットに対して有意差 ($p<0.05$) が認められたことを示す。¹採尿日の値を示す。²Trp 摂取量に対する排泄量の割合を示す。略称: Trp, トリプトファン; AnA, アンスラニル酸; KA, キヌレン酸; XA, キサンツレン酸。

表4 飼料中のニコチン酸欠-ビタミン混合含量の違いがニコチンアミドの異化代謝産物におよぼす影響

	合計量 ¹ (nmol/日)	Trp-Nam 転換率 ² (%)	Nam (nmol/日)	MNA (nmol/日)	2-Py (nmol/日)	4-Py (nmol/日)	4-Py/2-Py	(2-Py+4-P)/ MNA
健常ラット×0.3% VX	3169±269	1.37±0.13	69±4	155±21	136±21	2809±235	21.7±2.6	19.6±2.2
健常ラット×0.5% VX	3072±467	1.13±0.14	73±14	158±37	140±23	2701±400	20.0±2.2	19.6±2.4
健常ラット×1.0% VX	3287±172	1.38±0.06	79±8	150±6	150±17	2908±159	20.2±2.4	20.4±0.9
糖尿ラット×調整 0.3% VX	2088±250	0.43±0.04*	N.D. ³	1086±82*	114±20	907±242*	9.6±1.7*	0.9±0.3*
糖尿ラット×調整 0.5% VX	1981±362	0.52±0.16*	N.D.	961±94*	115±20	906±279*	7.6±2.4*	1.0±0.3*
糖尿ラット×調整 1.0% VX	2028±539	0.43±0.10*	N.D.	1018±315*	111±17	900±306*	8.1±2.1*	1.4±0.5*
2-way ANOVA <i>p</i> -values								
ストレプトゾトシン	<0.001	<0.001	—	<0.001	0.089	<0.001	<0.001	<0.001
ビタミン含量	0.932	0.735	—	0.908	0.962	0.938	0.687	0.877
ストレプトゾトシン× ビタミン含量	0.963	0.254	—	0.900	0.901	0.930	0.997	0.989

各値は平均値±標準誤差 ($n=5$) で示した。*健常ラットに対して有意差 ($p<0.05$) が認められたことを示す。¹合計量は Nam, MNA, 2-Py, 4-Py の合計を示す。²Trp-Nam 転換率 (%) = 合計量 (nmol/日) / トリプトファン摂取量 (nmol/日) × 100。 (例; 健常 0.3% VX ラットで, トリプトファン摂取量が 230 μ mol/日の時では, 3169/230000 × 100 = 1.378 \approx 1.38% となる。)³検出限界以下であることを示す。

中に含まれるカゼインのトリプトファンから生合成されたものである。ニコチンアミドとその異化代謝産物の尿中への合計排泄量と採尿時のトリプトファン摂取量からトリプトファン-ニコチンアミド転換率がもとめられる。その結果を表3に示した。この転換率も飼料中のビタミン含量の差異によって影響を受けることはなかった。

ニコチンアミドおよびその異化代謝産物であるMNA, 2-Py, 4-Pyの各排泄量を表4に示した。また異化代謝産物排泄量比, 4-Py/2-Py および (2-Py+4-Py)/MNA を表3に示した。これらの値は、摂取ビタミン量の差異によって影響を受けることはなかった。

3. 飼料中のビタミン混合量の差異が糖尿病ラットのトリプトファンの異化代謝におよぼす影響

ストレプトゾトシンを注射することで作成したI型糖尿病ラットのトリプトファン異化代謝が、摂取するビタミン量の違いによってどのように変動するのかを調べた。上記の健常ラットと同様に、低用量、中用量、十分量のビタミン混合を含んだ飼料を自由に摂取させた。投与した飼料のビタミン混合量は、後述の健常ラットと糖尿病ラット間での比較を行うに当たり、ラット1匹当たりの摂取するビタミンの絶対量を比較すべき二つの群間で等しくするために調整を行った。

トリプトファンの異化代謝産物であるアンスラニル酸、キヌレン酸、キサントレン酸は表3に示したように、糖尿病 Wistar 系雄ラットを低用量、中用量、十分量のニコチン酸フリーのビタミン混合を含む飼料を自由に摂取させた時において、各々の排泄量は、ビタミン混合の摂取量の差異による影響を全く受けなかった。

糖尿病ラットのトリプトファン-ニコチンアミド転換率を求めた。その結果を表4に示した。転換率は摂取するビタミン量の差異による影響を受けなかった。

糖尿病ラットのニコチンアミドおよびその異化代謝産物であるMNA, 2-Py, 4-Pyの各排泄量を表4に示した。また異化代謝産物排泄量比, 4-Py/2-Py および (2-Py+4-Py)/MNA を表4に示した。これらの値は、摂取ビタミン量の差異によって影響を受けることはなかった。

4. 健常ラットと糖尿病ラットのトリプトファン異化代謝の比較

上述のように、健常ラットおよび糖尿病ラットに低用量、中用量、あるいは十分量のビタミン混合を含む飼料を与えて、トリプトファンの異化代謝産物排泄量への影響、トリプトファン-ニコチンアミド転換率への影響、およびニコチンアミド異化代謝産物への影響を調べたが、調べた範囲内でのビタミン混合量の差異は、これらの指標に全く影響をおよぼすことはなかった(表3, 4)。

実験期間中の飼料摂取量は約2倍であったにもかかわらず、体重増加量は、糖尿病ラットの方が健常ラットよりも顕著に低い値であった。アンスラニル酸、キヌレン酸、キサントレン酸の1日尿中に排泄された絶対量は、糖尿病ラットと健常ラット間で差異は認められなかった

が、糖尿病ラットのトリプトファン摂取量が2倍であったために、トリプトファン摂取量に対する排泄量比率は糖尿病ラットが健常ラットの約0.4~0.5倍の値となった。糖尿病ラットのトリプトファン-ニコチンアミド転換率は健常ラットの約1/3にまで低下していた。これは、ニコチンアミドとその異化代謝産物量がトリプトファン摂取量に比して、低い値であったことを意味している。しかしながら、糖尿病ラットの1日尿中に排泄されたニコチンアミドおよびその異化代謝産物の絶対量が、健常ラットに比して一様に低いわけではなく、2-Py排泄量はほぼ等しく、MNAは高い値、4-Pyは顕著に低い値を示した。糖尿病ラットのニコチンアミド排泄量は検出限界以下であったが、これは、糖尿病ラットの尿量が300 mL/日と健常ラットの20倍も多く、ニコチンアミドが希釈されすぎて、検出限界以下になったものと推察された。

考 察

トリプトファン代謝には、B群ビタミンが必要である。ビタミンB₆の栄養状態を判断する一つの指標として、トリプトファン負荷後の尿中へのキサントレン酸排泄量を調べる方法^{28, 29)}が知られている。また、糖尿病患者の尿中には多量の3-ヒドロキシキヌレン酸とキサントレン酸が検出されること³⁰⁾や糖尿病ラットにトリプトファンを負荷するとキサントレン酸の排泄量が顕著に高くなることも古くから明らかにされており³¹⁾、糖尿病状態ではビタミンB₆の栄養状態が悪化していることが推察される。これは、キヌレン酸の代謝経路と関係している。キヌレン酸はビタミンB₂の補酵素型であるFADを補酵素とするキヌレン酸3-モノオキシゲナーゼ¹⁴⁾によって3-ヒドロキシキヌレン酸になるのか、ピリドキサルリン酸を補酵素とするキヌレン酸ナーゼ¹⁶⁾によってアンスラニル酸となるのか、あるいはピリドキサルリン酸を補酵素とするキヌレン酸アミノトランスフェラーゼ¹⁷⁾によってキヌレン酸になるのか、三つの可能性がある。キヌレン酸ナーゼのキヌレン酸と3-ヒドロキシキヌレン酸に対する反応性は、K_m値などのデータから¹⁶⁾、3-ヒドロキシキヌレン酸→3-ヒドロキシアンスラニル酸の方が高いと考えられている。したがって、キヌレン酸ナーゼは本来3-ヒドロキシキヌレン酸ナーゼと呼ばれるべきである。3-ヒドロキシキヌレン酸はキヌレン酸ナーゼによって3-ヒドロキシアンスラニル酸になるのか、キヌレン酸アミノトランスフェラーゼによってキサントレン酸になるのか、二つの可能性がある。キヌレン酸ナーゼは細胞質画分¹⁶⁾に、キヌレン酸アミノトランスフェラーゼはミトコンドリアの外膜中に存在する酵素である³²⁾。ビタミンB₆欠乏になると、細胞質に存在するキヌレン酸ナーゼはミトコンドリア外膜に存在するキヌレン酸アミノトランスフェラーゼよりも早くピリドキサルリン酸を失い、活性が低下するものと考えられる。その結果、キヌレニ

ンはキヌレニン3-モノオキシゲナーゼによって選択的に水酸化され、3-ヒドロキシキヌレニンが生成される。3-ヒドロキシキヌレニンは、ビタミンB₆不足では、キヌレニナーゼの触媒反応により3-ヒドロキシアンスラニル酸になることができないので、トリプトファン-ニコチンアミド代謝経路から考えれば、側路に位置するキヌレニンアミノトランスフェラーゼによってキサンツレン酸へと代謝される。つまり、深刻なビタミンB₆欠乏状態では、キヌレニンを代謝できる酵素が二つともビタミンB₆酵素であるために、キヌレニンが蓄積するものと考えられる。しかし、穏やかなビタミンB₆欠乏の場合は、ミトコンドリアの外膜に存在するキヌレニンアミノトランスフェラーゼよりも、細胞質画分に存在するキヌレニナーゼの方が、より早くピリドキサルリン酸を失うため、キヌレニンがキサンツレン酸の生成へと偏向するものと考えられている。しかし、どれほどのビタミンB₆欠乏でこのような代謝変動が起きるのかについては未だ十分な解明はなされていなかった。今回の実験結果では、幼若ラットの最大成長を保証する最低量の0.3%ビタミン混合食を投与しても、アンスラニル酸、キヌレン酸、キサンツレン酸の尿中排泄量が十分量のビタミン混合食を投与した時と比較して変動は認められなかった。したがって、トリプトファン-キサンツレン酸経路が主な代謝経路となるようなビタミンB₆栄養状態は、かなり深刻なビタミンB₆欠乏状態であると思われる。Schaeffer *et al.* は³³⁾、トリプトファン負荷によるキサンツレン酸の測定はビタミンB₆欠乏の鋭敏な判断方法としては適さないことを報告している。また、ビタミンB₆はトリプトファンから生成する神経伝達ホルモンであるセロトニンの合成にも関わっていることから³⁴⁾、糖尿病による神経障害を、ビタミンB₆の積極的な投与が緩和させることも報告されている³⁵⁾。今回の実験では、セロトニン関連物質の測定は行わなかったが、今後検討してみたい課題である。

ビタミンB₂が欠乏すると、FAD酵素であるキヌレニン3-モノキシゲナーゼ活性が低下し、キヌレニンの代謝はアンスラニル酸へと偏向することが予想される。今回の実験はすべてのビタミンを低用量にした群を設けたが、低用量ビタミン混合飼料を投与してもアンスラニル酸が増大することはなかった。したがって、0.3%ビタミン混合食に含まれるビタミンB₂量で、キヌレニン3-モノオキシゲナーゼは十分に酵素活性を発揮できるものと推察された。

ビタミンB₁は直接トリプトファンの異化代謝には関与していないが、キノリン酸からニコチン酸モノヌクレオチドが生成するときに必要な5-ホスホリボシル-1-ピリロン酸 (PRPP)³⁶⁾の生成系の一員であるトランスケトラーゼの補酵素として関与している。トリプトファン-ニコチンアミド転換率は飼料中のビタミン混合量の差異によって変動しなかったため、PRPP生合成反応系にも

異常がないものと推察された。ビタミンB₁の量もビタミン混合量が0.3%で必要量をまかなうことができたものと考えられる。

今回の実験結果から、低用量ビタミン混合食として使用した0.3%ビタミン混合食でも十分に幼若ラットの成長を支えることができ、さらにトリプトファンの異化代謝経路も正常に動かすことができることが明らかとなった。

糖尿病ラットは健常ラットの飼料摂取量の2倍の摂食があるにもかかわらず、アンスラニル酸、キヌレン酸、キサンツレン酸の排泄量が健常ラットに比して高い値を示すことはなく、ほぼ健常ラットと等しい値を示した。したがって、トリプトファンからの生成比率では糖尿病ラットは健常ラットの1/2程度であったことになる。このことは、糖尿病ラットではトリプトファンをアセチル-CoAに転換する経路の活性が強くなり、側路への流入量を著しく低下させる代謝変動が起きていることを意味する。これは、3-ヒドロキシアンスラニル酸ジオキシゲナーゼ活性の増大⁶⁾⁷⁾とアミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性の増大¹⁻³⁾⁶⁾⁷⁾という *in vitro* 実験の結果から説明が可能である。すなわち、糖尿病によってキサンツレン酸が増えるという現象は、トリプトファンの大量負荷により、トリプトファンの異化代謝の本経路が飽和した結果時にのみ見られる現象で、通常の飼料中から得られるトリプトファン摂取量では、トリプトファンはほとんど本経路で処理されてしまい、側路に流入する量は減少し、糖尿病時ではむしろ側路に位置するアンスラニル酸、キヌレン酸、キサンツレン酸の各生成量比は低下していることが明らかとなった。

ビタミンB₂欠乏ラットではトリプトファンからのニコチンアミドの生合成量が低下することが報告されている³⁷⁾。これは、キヌレニン3-モノオキシゲナーゼがFADを補酵素とするからである¹⁴⁾。さらに、ニコチンアミドの異化代謝酵素である2-Py生成MNA酸化酵素と4-Py生成MNA酸化酵素はFAD酵素であると推測されている³⁸⁾。したがって、ビタミンB₂欠乏ラットではこれらの酵素活性が検出限界以下にまで低下することで、MNA→2-PyおよびMNA→4-Pyの反応が抑制され、MNA排泄量が著しく高くなると考えられている。そして、(2-Py+4-Py)/MNA排泄量比が著しく低下するものと思われる。今回の実験では低用量のビタミン混合食でもこれら二つの比率は変動しなかった。したがって、この結果も0.3%ビタミン混合食に含まれるビタミンB₂含量で必要量をまかなっていることが推測された。

以上のことをまとめてみると、トリプトファン代謝にはB群ビタミンが補酵素として関わっていることから、飼料中のビタミン混合量を十分量、中用量、低用量とし、三つの飼料を健常ラットと糖尿病ラットに投与し、どのような代謝変動が起きるのか調べてみたが、ビタミン摂取量の差異による違いは全く見られなかった。このこと

は、糖尿病ラットにおいては、脂肪酸とアミノ酸の異化代謝が亢進され、これらの代謝に関わる B 群ビタミンの必要量に影響を与えると考え、通常食に混入される 1.0% ビタミン混合食¹⁹⁾ を基本として、1/2 量の 0.5% ビタミン混合食、1/3 量の 0.3% ビタミン混合食を投与したが、トリプトファンの異化代謝には変動がなかった。おそらく、他のアミノ酸や脂肪酸の異化代謝においても、0.3% ビタミン混合食で必要量をまかなうことができるものと思われた。さらに、低用量のビタミン混合食で調べてみる必要がある。

健常ラットと糖尿病ラットのトリプトファン異化代謝を比較してみると、多くの差異が観察された。従来から指摘されていたように¹⁷⁾、トリプトファンからのニコチンアミドへの生合成量は約 1/3 にまで低下していた。今回の実験においてはじめて明らかとなった最も顕著な特徴は MNA から 2-Py および 4-Py の生成量が著しく低下していたことであった。このことは、体内への MNA の蓄積を意味する。MNA の蓄積はニコチンアミドメチルトランスフェラーゼ活性を阻害することで³⁹⁾、ニコチンアミドの蓄積を招き、蓄積したニコチンアミドがポリ ADP-リボース合成酵素⁴⁰⁾ やヒストン脱アセチル化酵素活性⁴¹⁾ を阻害することで、細胞機能に悪影響をおよぼす可能性がある。このような推論が正しいとすると、糖尿病でトリプトファン-ニコチンアミド転換率が下がるのは、遊離型のニコチンアミドの蓄積を抑制する防御機構の一つとも考えることができ、したがって、糖尿病患者にニコチンアミドを投与することは好ましくないものと思われる。

本研究は、平成 19 年度～21 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)の成果の一部である。関係各位に謝意を表す。

文 献

- Mehler AH, McDaniel EG, Hundley JM (1958) Changes in the enzymatic composition of liver. I. Increase of picolinic carboxylase in diabetes. *J Biol Chem* **232**: 323-30.
- Ikedo M, Tsuji H, Nakamura S, Ichiyama A, Nishizuka Y, Hayaishi O (1965) Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. II. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. *J Biol Chem* **240**: 1395-401.
- Sanada H, Miyazaki M, Takahashi T (1980) Regulation of tryptophan-niacin metabolism in diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **26**: 449-59.
- McDaniel EG, Hundley JM, Sebrell WH (1956) Tryptophan-niacin metabolism in alloxan diabetic rats. *J Nutr* **59**: 407-23.
- Shibata K, Morita M, Matsuo H (1989) Urinary excretion of nicotinamide and its metabolites in alloxan-diabetic rats fed on a niacin-free diet. *Agric Biol Chem* **53**: 3353-4.
- Shibata K (1988) Tryptophan-NAD metabolism in streptozotocin diabetic rats. *Agric Biol Chem* **52**: 1993-8.
- Shibata K, Ishikawa A, Kondo T (1997) Effects of dietary pyrazinamide on the metabolism of tryptophan to niacin in streptozotocin-diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 1679-83.
- Leklem JE, Woodford J, Brown RR (1969) Comparative tryptophan metabolism in cats and rats: differences in adaptation of tryptophan oxygenase and in vivo metabolism of tryptophan, kynurenine and hydroxy kynurenine. *Comp Biochem Physiol* **31**: 95-109.
- Leklem JE (1971) Quantitative aspects of tryptophan metabolism in humans and other species: a review. *Am J Clin Nutr* **24**: 659-72.
- Rose DP, Braidman IP (1971) Excretion of tryptophan metabolites as affected by pregnancy, contraceptive steroids, and steroid hormones. *Am J Clin Nutr* **24**: 673-83.
- Kitamura J, Fukuwatari T, Ohta M, Higashida M, Sasaki R, Shibata K (2004) Comparison of the metabolism of tryptophan to niacin among humans, rats, and mice. *Journal of Creative Approach for Health* **3**: 125-30.
- Shibata K, Onodera M, Taniguchi M, Taniguchi N (1992) Metabolic fate of nicotinamide in LEC rats. *Biochem Int* **26**: 389-95.
- Takahashi K, Okuno A, Fukuwatari T, Shibata K (2009) Comparison of the nicotinamide catabolism among rat strains. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 274-9.
- Breton J, Avanzi N, Magagnin S, Covini N, Magistrelli G, Cozzi L, Isacchi A (2000) Functional characterization and mechanism of action of recombinant human kynurenine 3-hydroxylase. *Eur J Biochem* **267**: 1092-9.
- Ohkubo M, Sakiyama S, Fujimura S (1983) Purification and characterization of N¹-methylnicotinamide oxidase I and II separated from rat liver. *Arch Biochem Biophys* **221**: 534-42.
- Takeuchi F, Otsuka H, Shibata Y (1980) Purification and properties of kynureninase from rat liver. *J Biochem* **88**: 987-94.
- Han Q, Robinson H, Li J (2008) Crystal structure of human kynurenine aminotransferase II. *J Biol Chem* **283**: 3567-73.
- Talwar D, Davidson H, Cooney J, JO'Reilly DS (2000) Vitamin B₁ status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: comparison with erythrocyte transketolase activity assay. *Clin Chem* **46**: 704-10.
- Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* **127**: 838S-41S.
- Kashiba M, Oka J, Ichikawa R, Kasahara E, Inayama T,

- Kageyama A, Kageyama H, Osaka T, Umegaki K, Matsumoto A, Ishikawa T, Nishikimi M, Inoue M, Inoue S (2002) Impaired ascorbic acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Biol Med* **33**: 1221-30.
- 21) Nakamura S, Li H, Adijiang A, Pischetsrieder M, Niwa T (2007) Pyridoxal phosphate prevents progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **22**: 2165-74.
- 22) Pullman ME, Colowick SP (1954) Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*¹-methylnicotinamide. *J Biol Chem* **206**: 121-7.
- 23) Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **424**: 23-8.
- 24) Shibata K, Onodera M (1991) Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric Biol Chem* **55**: 143-8.
- 25) Shibata K (1988) Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, as endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **430**: 376-80.
- 26) Shibata K, Onodera M (1992) Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 974.
- 27) 柴田克己 (1987) 高速液体クロマトグラフィーによる尿中 *N*¹-メチルニコチンアミドの超微量定量法. *ビタミン* **61**, 599-604.
- 28) Brown RR (1981) The tryptophan load test as an index of vitamin B-6 nutrition. In *Methods in Vitamin B-6 Nutrition: Analysis and Assessment*. (Keklem JE, Reynolds RD eds), p 321-40. Plenum Press, New York.
- 29) Sauberlich HE, Canham JE Baker EM, Raica N, Herman YF (1972) Biochemical assessment of the nutritional status of vitamin B-6 in the human. *Am J Clin Nutr* **25**: 629-42.
- 30) Kotake Y, Tani S (1953) Studies on xanthurenic acid III. Xanthurenic acid in the urine of diabetic patient. *J Biochem* **40**: 295-9.
- 31) Rosen DA, Maengwyn-Davies GD, Beckee B, Stone HH, Freidenwald JS (1955) Xanthurenic acid studies in diabetics with and without retinopathy. *Proc Soc Exp Biol Med* **88**: 321-3.
- 32) Okamoto H, Hayaishi O (1970) Intramitochondrial localization of kynurenic acid aminotransferase. *J Biol Chem* **245**: 3603-5.
- 33) Schaeffer MC, Sampson DA, Skala JH, O'Connor DK, Gretz D (1991) Insensitivity of the tryptophan-load test to marginal vitamin B-6 intake in rats. *J Nutr* **121**: 1627-34.
- 34) Rahman MK, Nagatsu T, Sakurai T, Hori S, Abe M, Matsuda M (1982) Effect of pyridoxal phosphate deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase activity with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates in rats. *Jpn J Pharmacol* **32**: 803-11.
- 35) Abraham PM, Kuruvilla KP, Mathew J, Malat A, Joy S, Paulose CS (2010) Alterations in hippocampal serotonergic and INSR function in streptozotocin induced diabetic rats exposed to stress; neuroprotective role of pyridoxine and *Aegle marmelos*. *J Biomed Sci* **17**: 78.
- 36) Nishizuka Y, Hayaishi O (1963) Enzymic synthesis of niacin nucleotides from 3-hydroxyanthranilic acid in mammalian liver. *J Biol Chem* **238**: 483-5.
- 37) Henderson LM, Weinstock LM, Ramasarma GB (1951) Effect of deficiency of b vitamins on the metabolism of tryptophan by the rat. *J Biol Chem* **234**: 19-29.
- 38) 柴田克己 (1990) リボフラビン欠乏ラットのニコチンアミド異化代謝. *ビタミン* **64**, 589-95.
- 39) 田口 寛, 武藤秀弥, 稲森国勝, 奥村克純, 島林幸英 (1998) ニコチンアミドメチルトランスフェラーゼの分布とブタ肝臓酵素の基本的性質. *ビタミン* **62**, 559-64.
- 40) Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K (1992) Specific inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase and mono (ADP-ribosyl) transferase. *J Biol Chem* **267**: 1569-75.
- 41) Avalos JL, Bever KM, Wolberger C (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD⁺ cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell* **17**: 855-68.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **64**: 313–321 (2011)

Original Paper

Tryptophan-nicotinamide Metabolism in Rats with Streptozotocin-induced Diabetes:
Association of Dietary Vitamin Content

Eri Imai,¹ Mitsue Sano,¹ Tsutomu Fukuwatari,¹ and Katsumi Shibata^{*,1}

(Received March 4, 2011; Accepted June 28, 2011)

Summary: The B-group of vitamins, including vitamins B₁, B₂, and B₆, are involved in the catabolic metabolism of tryptophan. We investigated the effects of dietary vitamin content (low, moderate and sufficient) on the catabolism of tryptophan in both diabetic and healthy rats. We found that tryptophan catabolism was not affected by differences in dietary vitamin content in both diabetic and healthy rats. However, the tryptophan-nicotinamide conversion ratio was one-third lower in diabetic rats than in healthy rats. In addition, nicotinamide catabolism differed between diabetic and healthy rats. *N*¹-methylnicotinamide, a nicotinamide catabolite, accumulated in diabetic rats, but not in normal rats, possibly contributing to the increase in free nicotinamide. It seems likely that this increase in the level of nicotinamide inhibited the activities of poly (ADP-ribose) synthetase and histone deacetylase. These results suggest that administration of nicotinamide might offer some effects, and warrants further investigation.

Key words: streptozotocin, diabetes, tryptophan, nicotinamide, vitamin

* Corresponding author (E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp)

¹ Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522-8533, Japan

ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与ラットあるいは 十分量飼料投与ラットを寒冷曝露させた時の 肝臓, 血液および尿中のビタミン B₁ 量

柴田 克己^{*1}, 坂崎 愛¹, 佐野 光枝¹, 福渡 努¹

(2011年2月1日受付; 2011年6月29日受理)

要旨: 低温環境下ではエネルギー代謝の亢進が起こることが知られている。そこで本研究では、低温環境下においてビタミン B₁ の要求量がどの程度高まるかを調べた。まず最初にラットを低温環境下で 14 日間飼育すると、飼料摂取量は 1.1 倍に増加したが、体重増加量は 0.6 倍程度であった。したがって、寒冷曝露により 1.7 倍のエネルギー代謝の亢進が認められた。同時に、14 日間の寒冷曝露により、褐色脂肪組織 (BAT) が増加し、尿中のビタミン B₁ 排泄量は約 1/2 にまで抑制された。これらの事実によって、低温環境がエネルギー代謝の亢進をもたらす、ビタミン B₁ 必要量が増加したことが示唆された。さらにこのことを確認するために、ビタミン B₁ を最小必要量加えた飼料をラットに投与して寒冷曝露し、ビタミン B₁ 欠乏が引き起こされるか否かを調べたが、ビタミン B₁ を十分量投与した群と比べて顕著な体重増加量の低下は認められなかったが、ビタミン B₁ の尿中排泄量が低下したことから、寒冷曝露によってビタミン B₁ の必要量が高まったと考えられる。

キーワード: ビタミン B₁, 寒冷, 必要量, チロキシン, エネルギー

何らかの環境因子によってエネルギー消費量が亢進された時に、エネルギー代謝に関わっている B 群ビタミン必要量がどのような変動を示すかを明らかにすることは、疲労を軽減させる予防策をたてる上で大切な情報となる。日本人の食事摂取基準において、ビタミン B₁ の必要量は、エネルギー消費量が高まった時には増大するという考えに基づいてエネルギー消費量当たりで算定されている¹⁾。ビタミン B₁ 欠乏であるペリペリ (日本では脚気) がインドネシアなどの熱帯地方で多発していた時代には、環境温度とビタミン B₁ の必要量に関する研究がなされていた。日本においても、脚気には季節的な流行性があり、夏になると脚気に罹るヒトが増え、冬になると自然に治癒してしまったことから、明治時代には、脚気は細菌による伝染病であると多くの著名な脚気学者は考えていた。このことはすなわち、ビタミン B₁ の必要量が生活環境温度の影響を受ける可能性を示唆している。

我々は、栄養評価方法として多用されている「習慣的な栄養素摂取量」を「必要量」と比較する方法を補完する一つの方法として、非侵襲性の尿を生体指標とする評価方法を提案しつつある²⁻⁵⁾。尿中のビタミン排泄量は、

摂取量の影響を最も強く受けるが⁶⁾、他の環境因子にも影響を受けることが報告されている。

哺乳動物を低温環境下で飼育すると、体熱維持のためのエネルギー代謝を行わなければならない、エネルギー消費量が増大する。一方、高温環境下では体温のための熱産生を行う必要がないことから、エネルギー消費量は低下する⁷⁾ということが明らかになっている。しかし Mills⁸⁻¹⁰⁾ はビタミン B₁ の必要量は不快な 91°F (32.8°C) でラットを飼育すると 65°F (18.3°C) で飼育した場合と比較して 2 倍も高くなったと報告している。この Mills⁸⁻¹⁰⁾ の報告は、ビタミン B₁ の必要量はエネルギー消費量が高まった時には増大するという考え方¹⁾ からすると矛盾する報告である。一方で、Edison⁷⁾ は、ラットを高温環境下 (90°F : 32.2°C) で飼育すると快適温度環境下 (72°F : 22.2°C) の時と比較すると飼料摂取量が低下し体重増加量が落ちるが、ビタミン B₁ の必要量は高温環境下で高くなることはない⁸⁻¹⁰⁾ の説を否定している。むしろ、ラットのビタミン B₁ 欠乏症である多発性神経炎の発症を指標にすると、高温環境下ではビタミン B₁ の必要量は、快適温度環境下よりも低下すると報告している。Kline *et al.*¹¹⁾ は、ラットの多発性

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp)

¹ 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科 (522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500)

神経炎の治療に要するビタミン B₁ 量と体重増加量から、高温環境下 (90°F : 32.2°C) は快適温度環境下 (78°F : 25.6°C) よりもビタミン B₁ 必要量を低下させるということ、そして、この現象は高温環境下ではエネルギーの必要量が少ないためであろうと推察している。1950年代になると Hegsted & McPhee¹²⁾ は、55°F (12.8°C) では 78°F (25.6°C) よりもビタミン B₁ の必要量が增大することを、体重増加量を指標として明らかにした。すなわち、低温環境ではビタミン B₁ の必要量が増すことを報告した。しかしながら、それ以降、ビタミン B₁ の必要量と飼育温度との関係を調べた実験報告はなく、低温環境下で飼育した時の肝臓や血液中のビタミン B₁ 量が通常温度飼育下と比較し、低下しているか否かの情報はない。そこで、本実験では、ビタミン B₁ 摂取量が通常飼育温度下で十分量もしくは最小必要量になるように調整した飼料を与えたラットを、4°Cと22°Cに調整した飼育温度室で飼育した時の飼料摂取量、体重増加量、肝臓、白色脂肪組織 (WAT) および褐色脂肪組織 (BAT) 重量、肝臓および血液中ビタミン B₁ 濃度、尿中のビタミン B₁ 排泄量の比較を行った。

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。飼育室の温度は通常温度飼育群は22°C前後、寒冷曝露飼育群は4°C前後で、明暗サイクルは、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 系雄ラットは日本クレア(株)より購入した。購入後、新しい環境に順応させるために、直ちに、ラット用代謝ケージに個別に入れ、Table 1 に示した 20% カゼイン食 (チアミン塩酸塩含量は 0.6 mg/100 g 飼料) と水を自由に与えた。2週間予備飼育した後 (すなわち5週齢となった時点で) ラットの平均体重がほぼ均等になるように5匹ずつ4群に分け、飼育温度と摂取ビタミン B₁ 量によって通常温度飼育-ビタミン B₁ 十分量飼料投与群、通常温度飼育-ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与群、低温飼育-ビタミン B₁ 十分量飼料投与群、低温飼育-ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与群として、それぞれの環境温度下でそれぞれの飼料を与えて14日間飼育した。

通常温度飼育群には、Table 1 に示したチアミン塩酸塩含量が 0.6 mg/100 g のビタミン B₁ 十分量飼料、もしくはチアミン塩酸塩含量が 0.1 mg/100 g 飼料のビタミン B₁ 最小必要量飼料を投与した。事前の予備実験の結果、ラットを寒冷曝露すると、ラットの飼料摂取量が 1.1 倍に増加したことを踏まえ、本実験では比較する両温度飼育間のラットのビタミン B₁ 摂取量を同じとするために、寒冷曝露群の飼料中のビタミン B₁ 含量を調整した。低温飼育群のビタミン B₁ 十分量飼料投与群のチアミン塩酸塩含量を 0.54 mg/100 g とし、ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与群のチアミン塩酸塩含量を 0.09 mg/100 g とした (Table 1)。

飼育期間は14日間である。この間、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～10時の間に行い、体重と飼

Table 1 Compositions of the diets.

	V.B ₁ sufficient diet for normal temperature	V.B ₁ minimum requirement diet for normal temperature
	(%)	(%)
Vitamin free milk casein	20.0	20.0
L-Methionine	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	46.9	46.9
Sucrose	23.4	23.4
Corn oil	5.0	5.0
Mineral mixture (AIN-93G-MX)	3.5	3.5
Vitamin mixture (Vitamin B ₁ free AIN-93M-VX)	1.0	1.0
Thiamin-HCl	0.0006 (1.78 μmol/100 g diet)	0.0001 (0.30 μmol/100 g diet)
	V.B ₁ sufficient diet for cold temperature	V.B ₁ minimum requirement diet for cold temperature
	(%)	(%)
Vitamin free milk casein	20.0	20.0
L-Methionine	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	46.9	46.9
Sucrose	23.4	23.4
Corn oil	5.0	5.0
Mineral mixture (AIN-93G-MX)	3.5	3.5
Vitamin mixture (Vitamin B ₁ free AIN-93M-VX)	1.0	1.0
Thiamin-HCl	0.00054 (1.60 μmol/100 g diet)	0.00009 (0.27 μmol/100 g diet)

料摂取量を測定した。実験開始日を Day 1 として、飼育最終日の Day 14 の 1 日尿 (Day 14 の午前 9 時~Day 15 の午前 9 時:24 時間) を採取した。尿は塩酸酸性下で集め、分析に供するまで -20°C で保存した。

採尿終了後の Day 15 の午前 9 時~10 時に断頭にて屠殺し、血液を頸動脈から採取した。その後、肝臓、WAT、BAT を摘出し、重量を測定した。血液と肝臓はビタミン B₁ 測定用の試料を作成するための調製を直ちに行った (3. チアミンの測定を参照)。

精巣周囲の白色組織量を白色脂肪組織量 (WAT) とした。

褐色脂肪量 (BAT) は、肩胛骨の下部周辺の褐色がかった組織の量とした。

2. 化学薬品

ビタミンフリーミルクカゼイン、ショ糖、L-メチオニン、チアミン塩酸塩 (C₁₂H₁₇ClN₄O₅S-HCl=337.27) は和光純薬工業(株)(大阪)より購入した。コーンオイルは味の素(株)(東京)より購入した。 α -コーンスターチ、ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)¹³⁾、ビタミン混合 (AIN-93-VX)¹³⁾ はオリエンタル酵母工業(株)より購入した。他の化学薬品は市販品の中で最高純度のものを使用した。

3. チアミンの測定

3.1 血液 採取した直後の血液 0.1 mL に 0.5 mL の 5% トリクロロ酢酸を加え、均一化したのち、氷水中に 5 分間以上放置後、遠心分離 (10,000×g, 5 分間, 4°C) により得られた上清をマイクロフィルター (ポアサイズ 0.45 μ m) でろ過した液 50 μ L を直接 HPLC に注入した。

3.2 肝臓 摘出した直後の肝臓から約 0.2 g を切り出し、切り出した肝臓重量の 10 倍量の 5% トリクロロ酢酸を加え、テフロン-ガラスホモゲナイザーで均一化したのち、氷水中に 5 分間以上放置後、遠心分離 (10,000×g,

5 分間, 4°C) により得られた上清をマイクロフィルター (ポアサイズ 0.45 μ m) でろ過した液 50 μ L を直接 HPLC に注入した。

3.3 尿 凍結保存した尿を解凍後、マイクロフィルター (ポアサイズ 0.45 μ m) でろ過した。そのろ液 20 μ L を直接 HPLC に注入した。

HPLC の定量操作は文献 14) に示したポストカラム-HPLC 法にしたがった。分析条件の概要は、カラム: Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 4.6×250 mm), 移動相および流速: 5 mmol/L ペンタンスルホン酸ナトリウム塩と 1% アセトニトリルを含む 0.2 mol/L NaH₂PO₄, 1.0 mL/min, 反応液 1: 0.01% K₃Fe(CN)₆, 0.15 mL/min, 反応液 2: 15% NaOH, 0.15 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 分光蛍光光度計, 励起波長 365 nm, 蛍光波長 435 nm で行った。

4. 有意差検定

すべてのデータは平均値±SEM で示した。有意差検定は two-way ANOVA と Bonferroni ポストテストで行い、交互作用があったものに関しては追加で one-way ANOVA と Tukey の多重比較検定を行った。有意差は, $p < 0.05$ で判定した。なお, 検定は, 統計ソフト GraphPad Prism (version 5.01; GraphPad 社, San Diego, CA, USA) を使用して行った。

結 果

1. 基本的な栄養パラメーター

幼若ラットを、ビタミン B₁ を十分量含む飼料あるいは必要量含む飼料を投与して飼育室の温度が 22°C の通常温度室あるいは 4°C の低温室にて、14 日間飼育した。基本的な栄養パラメーターを Table 2 に示した。

飼料摂取量は飼料中のビタミン B₁ 含量に関係なく、予

Table 2 Effect of cold environment on the body weight gain, food intake, FER, the weights of liver, WAT and BAT.

	V.B ₁ sufficient group		V.B ₁ minimum requirement group		2-way ANOVA <i>p</i> -values ⁴		
	22°C	4°C	22°C	4°C	V ⁵	°C ⁶	V×°C
Initial body weight (g)	129.8±2.3	132.1±2.5	129.2±2.9	129.2±3.5	ns	ns	ns
Final body weight (g)	232.1±4.4	190.3±3.5*	231.5±4.2	194.1±6.7*	ns	<0.0001	ns
Body weight gain (g/14 d)	102.3±2.5	58.2±1.9*	102.3±0.7	64.9±4.2*	ns	<0.0001	ns
Food intake (g/14 d)	234.1±2.1	252.4±4.4*	227.7±1.5	253.1±3.9*	ns	<0.0001	ns
FER ¹	0.437±0.005	0.231±0.007*	0.449±0.004	0.256±0.005*	0.0033	<0.0001	ns
VB ₁ intake (μ g/14 d)	1,405±13	1,363±39	228±5 ⁵	228±4 ⁵	<0.0001	ns	ns
VB ₁ intake (μ mol/14 d)	4.17±0.038	4.04±0.116	0.68±0.015 ⁵	0.68±0.013 ⁵	<0.0001	ns	ns
Liver weight (g/rat)	10.84±0.32	8.67±0.39	11.17±0.38	9.92±0.48 ⁵	ns	0.0005	ns
WAT ² (g/rat)	2.66±1.0	1.89±0.09	2.07±0.07	1.76±0.13	ns	ns	ns
BAT ³ (g/rat)	0.527±0.040	0.812±0.076*	0.496±0.035	0.704±0.036*	ns	0.0001	ns

Values are expressed as mean ± SEM for 5 rats. ¹(body weight gain)/(food intake). ²White adipose tissues surrounding testes. ³Brown adipose tissues under scapulae. ⁴The *p*-values, obtained from two-way ANOVA analysis, are given for interaction effects. ns = not significant ($p > 0.05$). ⁵V: Vitamin. ⁶°C: Temperature. * Statistically significant difference at $p < 0.05$ between the two groups (22°C or 4°C) fed the same diet (V.B₁ sufficient group or V.B₁ minimum requirement group), as determined by two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test. ⁵ Statistically significant difference at $p < 0.05$ between the two groups (V.B₁ sufficient group or V.B₁ minimum requirement group) of the same temperature (22°C or 4°C), as determined by two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test.

Table 3 Effect of cold environment on the vitamin B₁ contents in liver, blood, and urine.

	V.B ₁		V.B ₁ minimum		2-way ANOVA		
	sufficient group		requirement group		<i>p</i> -values ¹		
	22°C	4°C	22°C	4°C	V ²	°C ³	V×°C
Liver (nmol/g)	17.4±1.3	17.3±0.7	4.5±0.3 [§]	3.6±0.2 [§]	<0.0001	ns	ns
Whole blood (pmol/mL)	421±25	412±25	126±16 [§]	116±4 [§]	<0.0001	ns	ns
Urine (nmol/d)	67.4±5.4 ^a	33.6±7.2 ^{ab}	1.6±0.1 ^c	1.2±0.24 ^d	<0.0001	0.0016	0.0019

Values are expressed as mean±SEM for 5 rats. ¹ The *p*-values, obtained from two-way ANOVA analysis, are given for interaction effects. ns = not significant (*p*>0.05). ² V: Vitamin. ³ °C: Temperature. [§] Statistically significant difference at *p*<0.05 between the two groups (V.B₁ sufficient group or V.B₁ minimum requirement group) of the same temperature (22°C or 4°C), as determined by two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test. Same alphabet denotes statistically insignificant difference between the respective means, while those with different alphabets denote statistically significant difference between such means at *p*<0.05 by one-way ANOVA with Tukey multiple comparison test.

備実験時と同じく寒冷曝露 (4°Cにて飼育) により, 通常温度飼育群 (22°Cにて飼育) と比較して, 1.1 倍に増加した。しかしながら, 体重増加量は, 通常温度飼育群の 0.6 倍に減少した。したがって, 飼料効率比は, 寒冷曝露により, 約 1/2 の値となった。ビタミン B₁ の摂取量にかかわらず, 寒冷曝露により, 肝臓重量は約 0.9 倍に低下し, BAT 重量は寒冷曝露により 1.5 倍に増大した。

2. ビタミン B₁ 含量

肝臓および血液中ビタミン B₁ 濃度, 尿中のビタミン B₁ 排泄量を Table 3 に示した。肝臓中の濃度 (1 g 当たりの含量) と血液中の濃度は寒冷曝露の影響を受けなかった。逆に, 尿中への排泄量は寒冷曝露により, ビタミン B₁ 摂取量が十分量の場合でも最小必要量摂取量でも, 約 0.5 倍に低下した。

考 察

ラットを低温環境下で飼育すると, 褐色脂肪細胞が多くなり, また, 飼料摂取量が 1.1 倍に増加しても体重の増加量は 0.6 倍程度と低かったことから, 本実験条件下では, 低温曝露によって 1.7 倍のエネルギー代謝の亢進がもたらされたものと考えられた。

低温で飼育されたラット肝臓のビタミン B₁ 量は, 肝臓単位重量当たりでは, 飼育温度による差異は認められなかった。血液中の濃度は, 飼育温度の影響を受けなかったが, 尿中への排泄量は, 寒冷曝露により顕著に低下した。これらの結果は, 寒冷曝露により, 体温を維持するために, 炭水化物などからのエネルギー代謝が亢進され, ビタミン B₁ の必要量が高くなった結果, 尿中への排泄量が抑制されたと考えられる。

ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与群ラットの実験期間中の 1 日平均ビタミン B₁ 摂取量は約 12.5 nmol (チアミン塩酸塩量として 4 μg 程度), 平均体重は約 150 g であった。1 kg 体重当たりのチアミン塩酸塩摂取量は 25 μg 程度と計算された。おそらく, この 25 μg/日/kg 体重程度のチアミン塩酸塩を摂取することができれば, ビタミン B₁ 欠乏に陥ることはないかと予想される。過去の報告によると, 幼若ラットにビタミン B₁ 欠乏食を与えると, 概ね 5 日後当たりから飼料摂取量が落ち, 10 日後当たり

から体重が減少しはじめ, 25 日後あたりでは死亡するラットが出てくることが見いだされている¹⁵⁾¹⁶⁾。実際に, ビタミン B₁ 欠食を与え, すでにビタミン B₁ 欠乏が顕在化しているラットの肝臓中のビタミン B₁ の値は 2.75 nmol/g 程度であったと報告されている¹⁵⁾。本実験の低温飼育-ビタミン B₁ 最小必要量投与ラットの肝臓ビタミン B₁ 濃度は 3.6 nmol/g 程度であった。この数値は上記の 2.75 nmol/g よりも高い値であった。このことから低温飼育-ビタミン B₁ 最小必要量投与ラットはビタミン B₁ 欠乏状態に陥っていないと考えられる。

血液中の値は, 摂取した飼料からの吸収量, 貯蔵庫である肝臓からの放出量, 非肝臓組織の取り込み量, さらに腎臓を介する尿中への排泄量などによって厳密に調節されているものと推察される。したがって, 血液中のビタミン B₁ 濃度は肝臓中のビタミン B₁ の備蓄量が枯渇しない限り, 低下しないものと考えられる。本実験においても, 肝臓中のビタミン B₁ 量が寒冷曝露により枯渇しなかったため, 血液中のビタミン B₁ 濃度も変化しなかったものと考えられた。

尿中へのビタミン B₁ 排泄量は, 寒冷曝露により, ビタミン B₁ 十分量摂取群では約 1/2 にまで低下した一方で, 血液中の値は通常温度飼育群と同じ値が維持されていた。ビタミン B₁ 十分量飼料投与群と最小必要量飼料投与群を比較すると, ビタミン B₁ の摂取量は約 1/5 であったが, 肝臓中も血液中也もビタミン B₁ 含量は約 1/3 であった。このことは, ラットは低温にさらされると, すべての組織中のビタミン B₁ 必要量が高まり, その結果引き起こされる欠乏リスクを下げるために, ビタミン B₁ の備蓄庫である肝臓からの放出を促進させる一方で, 尿中への排泄量を抑制する (言い換えれば, 腎臓での再吸収を高める) 機構が作動することが示唆された。なお, ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与群では, 基本的な排泄量が低く, 正確な比較をすることはできなかったが, 尿中への排泄量は抑制されていた。これらの事実は, 尿を用いるビタミン B₁ の栄養評価をより正確にするためには, 評価する対象者の主要な生活がどのような環境温度であったのかを調査要因の一つとして加えておく必要性を示している。

寒冷曝露によりエネルギー代謝の亢進が起こることが Hegsted & McPhee¹²⁾ によって報告されていたが、本実験においてもこのことが確認された。その結果、ビタミン B₁ の要求量が高まり、ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与ラットでは、ビタミン B₁ 十分量飼料投与群と比べて、顕著な悪影響が認められることを期待したが、今回の実験条件下では、肉眼的な外見所見では摂取ビタミン B₁ 含量による差異は認められなかった。大きな差異が認められたのは、摂取ビタミン B₁ 量に関係なく、通常温度飼育群と寒冷曝露群間の体重増加量の差異であった。寒冷曝露により体重増加量が約半分となった。寒冷曝露-ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与群の体重増加量と寒冷曝露-ビタミン B₁ 十分量飼料投与群の体重増加量には差異は認められなかった。寒冷曝露による体重増加量の低下は、本実験条件下では、少なくとも、摂取するビタミン B₁ 量とは関係がないことが明らかとなった。低温度飼育-ビタミン B₁ 最小必要量飼料投与群においても、肝臓のビタミン B₁ 量は、完全なビタミン B₁ 欠乏ラット¹⁵⁾ よりも高い値であった。しかしながら、本実験条件下において、寒冷曝露により、尿中排泄量が顕著に抑制されたことから、低温環境下では、ビタミン B₁ の必要量が高くなることが示唆された。

これまでの報告において、寒冷曝露によって甲状腺の機能亢進が起こり、チロキシンの放出が著しく増加することが明らかにされている¹⁷⁾。ラットにチロキシンを含む飼料を投与すると、含まない飼料投与群に比して、チロキシン投与7日後より、1.5倍量の飼料を摂取するにもかかわらず、体重増加量が約半分であったことも報告されている¹⁸⁾。また、副腎髄質からアドレナリンが分泌され、肝臓や筋肉細胞の活動を高めて、熱の発生量を増加させることも知られている¹⁹⁾。アドレナリンをラットに注射すると、飼料摂取量が落ちて体重増加量が低下することも報告されている²⁰⁾。さらに寒冷曝露(5°C)によって褐色脂肪組織での UCP mRNA の発現量が増加することも報告されている²¹⁾。

チロキシン投与の報告は、今回の実験結果と同じ現象であった。したがって、寒冷曝露による飼料摂取量の増大と体重増加量の遅延という現象は、エネルギー代謝亢進によるビタミン B₁ 必要量の増大に起因するビタミン欠乏の結果ではなく、寒冷曝露によりチロキシンの放出が高まったこと、また同時に熱産生のために UCP の発現量が増加したといった複数の要因による現象ではないかと考えられる。

本研究により、寒冷環境下においてビタミン B₁ の尿中の排泄量が顕著に低下し、ビタミン B₁ の必要量が増大することが明らかになった。しかし、寒冷曝露により尿中へのビタミン B₁ 排泄量が低くなるという現象に関する機構の解明については明らかになっておらず、今後の課題としたい。

本研究は、平成 19 年度～21 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)の成果の一部である。関係各位に謝意を表す。

文 献

- 1) 日本人の食事摂取基準 2010 年版, 厚生労働省, 2009. ホームページ: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/sessyu-kijun.html>
- 2) Fukuwatari T, Shibata K (2008) Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* **54**: 223-9.
- 3) Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, Shibata K (2010) Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamin levels correlate with their intakes in free-living Japanese school children. *Public Health Nutr* **25**: 1-7.
- 4) Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, Shibata K (2010) Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamins correlate with their vitamin intakes in free-living Japanese university students. *Eur J Clin Nutr* **64**: 800-7.
- 5) Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, Shibata K (2010) Urinary excretion of vitamin B₁, B₂, B₆, niacin, pantothenic acid, folate, and vitamin C correlates with dietary intakes of free-living elderly, female Japanese. *Nutr Res* **30**: 171-8.
- 6) Fukuwatari T and Shibata K (2008) Urinary water-soluble vitamins and their metabolite contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* **54**: 223-9.
- 7) Edison AR, Silber H, Tennen DM (1945) The effect of varied thiamine intake on the growth of rats in tropical environment. *Am J Physiol* **144**: 643-51.
- 8) Mills CA (1941) Environmental temperatures and thiamine requirements. *Am J Physiol* **133**: 525-31.
- 9) Mills CA (1943) Heightened thiamine and choline requirements in tropical heat. *Proc Soc Exp Biol Med* **54**: 265-6.
- 10) Mills CA, Cottingham E, Taylor E (1947) The influence of experimental temperature on dietary requirement for thiamine, pyridoxine, nicotinic acid, folic acid, and choline in chicks. *Am J Physiol* **149**: 376-82.
- 11) Kline OL, Friedman L, Nelson FM (1945) The effect of environmental temperature on the thiamine requirement of the rat. *J Nutr* **29**: 35-42.
- 12) Hegsted DM, McPhee GS (1950) The thiamine requirement of the adult rat and the influence on it of a low environmental temperature. *J Nutr* **10**: 127-36.
- 13) Reeves RG (1998) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* **127**: 838S-41S.
- 14) 福渡 努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己 (2004) 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* **45**, 231-8.
- 15) 柴田克己, 村田希久 (1985) チアミン欠乏ラットおよ

- びニコチンアミド大量負荷チアミン欠乏ラットのトリプトファン-NAD代謝. *ビタミン* **59**: 555-63.
- 16) Shibata K, Kondo T, Yonezima M (1997) Conversion ratio of tryptophan to niacin in rats fed a vitamin B₁-free diet. *J Nutr Sci Vitaminol* **43**: 479-83.
- 17) Kassenaar A, Lameyer LD, Querido A (1959) Studies on the peripheral disappearance of thyroid hormone. VI. The effect of environmental temperature on the distribution of ¹³¹I in thyroidectomized, 1-thyroxine maintained rats after the injection of ¹³¹I 1-thyroxine. *Acta Endocrinol* **32**: 575-8.
- 18) Shibata K, Toda S (1994) Effects of thyroxin on the conversion ratio of tryptophan to nicotinamide in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 1757-62.
- 19) Brown MR, Fisher LA (1984) Brain peptide regulation of adrenal epinephrine secretion. *Am J Physiol* **247**: E41-6.
- 20) Shibata K (1995) Effects of adrenalin on the conversion ratio of tryptophan to niacin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 2127-9.
- 21) Ricquier D, Mory G, Bouillaud F, Thibault J, Weissenbach J (1984) Rapid increase of mitochondrial uncoupling protein and its mRNA in stimulated brown adipose tissue. *FEBS Lett* **178**: 240-4.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **64**: 329-334 (2011)

Research Data

Liver, Blood, and Urine Vitamin B₁ Content in Cold-exposed Rats Fed a Vitamin B₁-sufficient or Minimum-requirement Diet

Katsumi Shibata,^{*,1} Ai Sakazaki,¹ Mitsue Sano,¹ and Tsutomu Fukuwatari¹

(Received February 1, 2011; Accepted June 29, 2011)

Summary: Energy metabolism is facilitated by exposure to cold because of thermogenesis. However, it is unclear how a low temperature environment affects vitamin B₁ requirements. Therefore, in this study, we examined how the requirement for vitamin B₁ in rats is increased upon exposure to cold. Rats housed for 14 days at 4°C showed a 1.1-fold increase in food intake and a 0.6-fold decrease of body weight gain. Hence, the cold environment increased energy expenditure 1.7-fold. Furthermore, these rats had larger brown adipose tissue depots, while urinary excretion of vitamin B₁ was decreased 0.5-fold. These results suggest that the requirement for vitamin B₁ was increased by cold exposure. We then examined the effects of feeding cold-exposed rats a diet containing the minimum level of vitamin B₁, in terms of changes in body weight, in comparison with rats fed a diet containing a sufficient level of vitamin B₁. Urinary excretion of vitamin B₁ was lower in rats housed for 14 days at 4°C than at 22°C. However, no marked changes in body weight were observed. These results indicate that exposure to a low-temperature environment increases energy metabolism, and that the requirement for vitamin B₁ also increases.

Key words: vitamin B₁, cold, requirement, thyroxin, energy

* Corresponding author (E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp)

¹ Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522-8522, Japan

資料

ビタミン B₁₂ 欠乏ラットの種々の臓器, 血清, 尿中の B 群ビタミン含量

¹ 滋賀県立大学 人間文化学部 生活栄養学科, ² 岡山大学大学院 教育学研究科 家政学

柴田 克己¹, 河田 哲典², 石田 香織², 清水 篤史¹
守谷 彩¹, 寺方 美希¹, 佐野 光枝¹, 福渡 努¹

Vitamins (Japan), **85** (1), 18-22 (2011)

The contents of B-group vitamins in various tissues, serum, and urine of vitamin B₁₂-deficient rats

Katsumi Shibata¹, Tetsunori Kawata², Kaori Ishida², Atsushi Shimizu¹, Aya Moriya¹,
Miki Terakata¹, Mitsue Sano¹, Tsutomu Fukuwatari¹

¹Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, 2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan.

²Laboratory of Nutrition, Division of Life, Health, and Sports Education, Graduate School of Education, Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka, Okayama 700-8530, Japan

We measured the contents of B-group vitamins in the urine, serum, liver, and kidney of vitamin B₁₂-deficient rats. Urine and liver vitamin B₁₂ contents in urine and liver were lower in the B₁₂-deficient rats than in the control rats. Contents of vitamin B₂, nicotinamide, and pantothenic acid in the urine, liver and kidney were not different between the B₁₂-deficient and control rats. On the other hand, contents of vitamin B₁, vitamin B₆, folate, and biotin in the urine, liver, and kidney were different between the two groups. Vitamin B₁ and folate contents in the urine, liver, and kidney were lower in the B₁₂-deficient rats than in the control rats. Vitamin B₆ content in the liver was almost equal between both groups, but, the content in urine was lower and that of kidney was higher in the B₁₂-deficient rats than in the control rats. Biotin content in the urine and kidney was higher in the B₁₂-deficient rats, but the content in the liver was lower in the B₁₂-deficient rats.

Key words : B-group vitamin, vitamin B₁₂ deficiency, urine, liver, kidney

(Received November 11, 2009)

緒言

B 群ビタミン 8 種類すべては、酵素の補酵素として機能しているため、体内動態が相互に影響を及ぼしているものと考えられる。相互関係がよく知られているビタミンとして、複合酵素系として研究されてきた α -ケト酸脱

水素酵素系のナイアシン、ビタミン B₁、ビタミン B₂、パントテン酸がある¹⁾。さらに、ホモシステイン代謝に関わる葉酸、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂ がある²⁾。そこで、一つの B 群ビタミンを欠乏させた時に、他の B 群ビタミンの体内動態がどのような影響を受けるのか否かを調べる研究を開始した。

¹ 〒 522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

² 〒 700-8530 岡山市津島中 3-1-1

ビタミンの体内動態を研究するためには濃度を測定するだけでは極めて不十分であることは言うまでもないが、研究の第一段階としてそのビタミンの臓器中の濃度を知ること何らかの手がかりをもたらすと考えられる。8種類の B 群ビタミン欠乏動物のすべての結果を得るまでには長期間を要するので、今回はビタミン B₁₂ 欠乏動物を作成し、尿、肝臓、腎臓、脳、精巣、血清中の B 群ビタミン濃度を測定した結果を報告する。なお、ビタミンの種類によって一部の臓器に関する結果が欠落しているが、これは試料量が不十分で分析ができなかったためである。

実験方法

1. 動物の飼育方法

10 週齢の Wistar 系雌ラットを交配、受精確認後、直ちに妊娠期間、授乳期間を通しビタミン B₁₂ 欠乏飼料(表 1)を給与した親ラットから出生、離乳した雌雄ラットを実験に用いた。

離乳したラット(3 週齢)は、雌雄別々の群とし、さらにビタミン B₁₂ 欠乏ラット作成群と対照ラット作成群とに分けた。ビタミン B₁₂ 欠乏ラット作成群はビタミン B₁₂ 欠乏飼料のみを与えた。

一方、対照ラット作成群はビタミン B₁₂ 欠乏ラット作

表 1. ビタミン B₁₂ 欠乏食の栄養素組成

栄養成分	ビタミン B ₁₂ 欠乏食 (g/kg 飼料)
分離大豆タンパク質 ¹	180
グルコース ²	673.5
脂溶性ビタミン ³ 混合大豆油 ⁴	100
ミネラル混合 ⁵	35
水溶性ビタミン混合(ビタミン B ₁₂ 欠) ⁶	10
塩化コリン ⁷	1.5

¹ アジプロン SU, 粗タンパク質含量は 85.4%, 味の素株式会社(東京都)より購入。

² サンエイ糖化株式会社(愛媛県)より購入。

³ 飼料 1kg 当たりの脂溶性ビタミン含量: dl- α -トコフェリルアセテート, 35 mg; レチニルアセテート, 4,000IU; コレカルシフェロール 1,000 IU. これらのビタミンは和光純薬工業株式会社(東京都)より購入。

⁴ 林化学工業株式会社(東京都)より購入。

⁵ ミネラル混合 1kg 当たりのミネラル含量 (g/kg ミネラル混合), AIN-76 ミネラル混合: CaHPO₄, 500; NaCl, 74; K₃C₆H₅O₇·H₂O, 220; K₂SO₄, 52; MgO, 24; MnCO₃, 3.5; Fe-citrate (Fe 17%), 6; ZnCO₃, 1.6; CuCO₃·Cu(OH)₂·H₂O, 0.3; KIO₃, 0.01; Na₂SeO₃·5H₂O, 0.01; and CrK(SO₄)₂·12H₂O, 0.55. ショ糖で 1kg に調製した。これらのミネラルは和光純薬工業株式会社(東京都)より購入。

⁶ 水溶性ビタミン混合 1kg 当たりの水溶性ビタミン含量 (mg/kg 水溶性ビタミン混合), AIN-76 ビタミン混合: 塩酸チアミン, 600; リボフラビン, 600; 塩酸ピリドキシン, 700; ニコチン酸, 3,000; パントテン酸カルシウム, 1,600; プテロイルモノグルタミン酸, 200; ビオチン, 20; メナジオン, 5. ショ糖で 1kg に調製した。これらのビタミンは和光純薬工業株式会社(東京都)より購入。

表 2. ビタミン B₁₂ 欠乏食の投与が体重と組織重量におよぼす影響

	雄ラット		雌ラット	
	Pair-fed 対照群	V.B ₁₂ 欠乏群	Pair-fed 対照群	V.B ₁₂ 欠乏群
体重増加量 (g)	178 ± 11 (n = 10)	131 ± 19* (n = 10)	162 ± 7 (n = 10)	129 ± 22* (n = 7)
肝臓 (g)	5.78 ± 0.43 (n = 10)	7.16 ± 1.00* (n = 10)	4.55 ± 0.34 (n = 10)	7.10 ± 0.89* (n = 7)
脳 (g)	1.72 ± 0.08 (n = 10)	1.56 ± 0.09 (n = 10)	1.66 ± 0.06 (n = 10)	1.60 ± 0.07 (n = 7)
腎臓 (g)	1.36 ± 0.14 (n = 10)	1.95 ± 0.35* (n = 10)	1.18 ± 0.13 (n = 10)	1.83 ± 0.18* (n = 7)
精巣 (g)	2.57 ± 0.11 (n = 10)	0.71 ± 0.18* (n = 10)	-	-

約 3 週齢の離乳した雌雄ラットを pair-fed 対照群とビタミン B₁₂ 欠乏群の二群に分けた。二群ともビタミン B₁₂ 欠乏食を投与したが, pair-fed 対照群のラットには毎日 1 μ g のシアノコバラミンを経口投与した。シアノコバラミンを投与したラットの食欲はビタミン B₁₂ 欠乏食のみを投与したラットよりも高いので、摂食量をビタミン B₁₂ 欠乏食群のラットと同じ摂取量になるように pair-fed した。雄ラットは 98-108 日間、雌ラットは 150-159 日間飼育したのち、屠殺した。

数値は平均値 ± SEM で示した。

*Pair-fed 対照群とビタミン B₁₂ 欠乏群との間で Student の *t* 検定を行った結果、有意差 ($p < 0.05$) が認められたことを示す。

成群と同じ飼料を与え、かつ pair-fed としたが、実験期間中シアノコバラミン水溶液を $1 \mu\text{g}/\text{rat}/\text{day}$ となるように $50 \mu\text{L}$ 経口投与し、ビタミン B₁₂ 欠乏を回避させた。なお、飼料の交換、シアノコバラミン投与は飼育期間中毎日 9 時から 12 時に行った。

なお、飼育期間は、雄ラットは 98 ~ 108 日間、雌ラットは 150 ~ 159 日である。表 2 に解剖時の体重増加量、臓器重量を記載した。

飼育最終日直前の 24 時間尿を採取した後、心臓採血により血液を採取、肝臓、腎臓、脳、精巣を摘出、分析まで -80°C で保存した。なお、本研究は動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和 55 年 3 月、総理府告示、第 6 号）、岡山大学動物実験指針、教育学部動物実験指針に従った。

2. ビタミンの測定方法

採尿方法、血液の採集、並びに各々の B 群ビタミンの測定方法は文献 3 に記載した方法を用いた。

3. 統計処理

値は平均値 \pm SEM で示した。二群間の値の比較は、GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 5 を使用し、un-paired Student's t-test を行い、 $p < 0.05$ を有意差があるとした。

測定結果

対照ラットとビタミン B₁₂ 欠乏ラットの B 群ビタミン含量を、雄ラットについては表 3 に、雌ラットについて

表 3. ビタミン B₁₂ 欠乏食投与が雄ラットの尿中および肝臓、腎臓、脳中の B 群ビタミン含量におよぼす影響

	尿 (nmol/day)	肝臓 (nmol/g)	腎臓 (nmol/g)	脳 (nmol/g)
ビタミン B ₁				
Pair-fed 対照群	20.6 \pm 2.6 (n = 10)	19.6 \pm 1.2 (n = 8)	55.6 \pm 6.0 (n = 8)	6.35 \pm 0.37 (n = 8)
V.B ₁₂ 欠乏群	5.2 \pm 0.4* (n = 10)	14.8 \pm 1.5* (n = 5)	26.5 \pm 2.3* (n = 5)	4.70 \pm 0.61 (n = 5)
ビタミン B ₂				
Pair-fed 対照群	69.0 \pm 7.9 (n = 10)	77.8 \pm 6.2 (n = 8)	75.4 \pm 6.4 (n = 8)	3.93 \pm 0.21 (n = 8)
V.B ₁₂ 欠乏群	60.4 \pm 8.8 (n = 10)	72.8 \pm 4.2 (n = 5)	71.7 \pm 4.0 (n = 5)	3.99 \pm 0.34 (n = 5)
ビタミン B ₆ ¹				
Pair-fed 対照群	85.5 \pm 4.3 (n = 10)	27.1 \pm 0.9 (n = 10)	21.5 \pm 2.4 (n = 6)	8.4 \pm 0.3 (n = 8)
V.B ₁₂ 欠乏群	34.2 \pm 2.0* (n = 10)	28.6 \pm 1.2 (n = 5)	40.5 \pm 2.1* (n = 4)	8.7 \pm 0.2 (n = 8)
ビタミン B ₁₂				
Pair-fed 対照群	13.7 \pm 3.7 (n = 10)	47.4 \pm 4.4 (n = 8)	no data	no data
V.B ₁₂ 欠乏群	0.3 \pm 0.1* (n = 10)	13.0 \pm 1.2* (n = 5)	no data	no data
ニコチンアミド ²				
Pair-fed 対照群	2241 \pm 164 (n = 10)	1379 \pm 86 (n = 8)	1255 \pm 81 (n = 8)	546 \pm 20 (n = 8)
V.B ₁₂ 欠乏群	2918 \pm 259 (n = 10)	1224 \pm 132 (n = 5)	1251 \pm 113 (n = 5)	517 \pm 8 (n = 6)
パントテン酸				
Pair-fed 対照群	381 \pm 46 (n = 10)	501 \pm 5 (n = 8)	314 \pm 50 (n = 5)	77 \pm 12 (n = 6)
V.B ₁₂ 欠乏群	322 \pm 32 (n = 10)	557 \pm 15 (n = 5)	343 \pm 28 (n = 5)	48 \pm 9 (n = 4)
葉酸				
Pair-fed 対照群	2.78 \pm 0.31 (n = 10)	10.0 \pm 1.0 (n = 8)	4.71 \pm 0.19 (n = 8)	no data
V.B ₁₂ 欠乏群	1.30 \pm 0.08* (n = 10)	4.7 \pm 0.9* (n = 5)	1.67 \pm 0.33* (n = 5)	no data
ビオチン				
Pair-fed 対照群	0.97 \pm 0.09 (n = 10)	1.29 \pm 0.13 (n = 8)	1.08 \pm 0.06 (n = 8)	no data
V.B ₁₂ 欠乏群	2.18 \pm 0.30* (n = 10)	0.80 \pm 0.21* (n = 5)	1.57 \pm 0.08* (n = 5)	no data

実験条件は表 2 の下の説明に記載した。

数値は平均値 \pm SEM で示した。

*Pair-fed 対照群とビタミン B₁₂ 欠乏群との間で Student の t 検定を行った結果、有意差 ($p < 0.05$) が認められたことを示す。

¹ この表ではビタミン B₆ と表記したが、4-ピリドキシン酸の量である。4-ピリドキシン酸は尿中に排泄される主要なビタミン B₆ の異化代謝産物である。

² この表ではニコチンアミドと表記したが、ニコチンアミドとその異化代謝産物である N¹-メチルニコチンアミド、N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミドの合計量である。

表4. ビタミンB₁₂欠乏食投与が雌ラットの尿中および血清、肝臓、腎臓、脳中のB群ビタミン含量におよぼす影響

	尿 (nmol/day)	血清 (nmol/ml)	肝臓 (nmol/g)	腎臓 (nmol/g)	脳 (nmol/g)
ビタミンB ₁					
Pair-fed 対照群	52.4 ± 4.1 (n = 10)	no data	18.0 ± 1.0 (n = 9)	45.6 ± 1.4 (n = 6)	4.98 ± 0.32 (n = 8)
V.B ₁₂ 欠乏群	7.0 ± 1.0* (n = 6)	no data	11.2 ± 0.8* (n = 7)	17.2 ± 1.2* (n = 7)	4.61 ± 0.61 (n = 4)
ビタミンB ₂					
Pair-fed 対照群	65.0 ± 2.8 (n = 10)	no data	65.1 ± 5.5 (n = 10)	68.5 ± 1.9 (n = 6)	3.57 ± 0.04 (n = 10)
V.B ₁₂ 欠乏群	64.4 ± 7.1 (n = 6)	no data	67.3 ± 5.6 (n = 7)	67.9 ± 1.5 (n = 7)	3.66 ± 0.18 (n = 6)
ビタミンB ₆ ¹					
Pair-fed 対照群	80.5 ± 3.7 (n = 10)	1.27 ± 0.08 (n = 10)	21.4 ± 0.6 (n = 10)	20.8 ± 1.2 (n = 10)	9.1 ± 0.4 (n = 8)
V.B ₁₂ 欠乏群	56.1 ± 3.7* (n = 6)	1.17 ± 0.11 (n = 7)	24.1 ± 1.9 (n = 6)	40.1 ± 3.6* (n = 7)	9.3 ± 0.4 (n = 4)
ビタミンB ₁₂					
Pair-fed 対照群	27.0 ± 6.1 (n = 10)	0.73 ± 0.06 (n = 10)	46.2 ± 3.7 (n = 10)	no data	no data
V.B ₁₂ 欠乏群	3.3 ± 1.6* (n = 6)	0.29 ± 0.01* (n = 6)	15.3 ± 0.9* (n = 6)	no data	no data
ニコチンアミド ²					
Pair-fed 対照群	2688 ± 228 (n = 10)	no data	1284 ± 78 (n = 10)	1267 ± 20 (n = 6)	585 ± 28 (n = 8)
V.B ₁₂ 欠乏群	2596 ± 443 (n = 6)	no data	1286 ± 93 (n = 6)	1302 ± 48 (n = 5)	599 ± 22 (n = 6)
パントテン酸					
Pair-fed 対照群	379 ± 18 (n = 10)	no data	560 ± 25 (n = 10)	no data	no data
V.B ₁₂ 欠乏群	336 ± 30 (n = 6)	no data	565 ± 74 (n = 7)	no data	no data
葉酸					
Pair-fed 対照群	3.54 ± 0.24 (n = 6)	no data	12.5 ± 0.8 (n = 10)	5.23 ± 0.30 (n = 6)	no data
V.B ₁₂ 欠乏群	1.40 ± 0.11* (n = 13)	no data	4.3 ± 0.5* (n = 7)	2.11 ± 0.43* (n = 7)	no data
ビオチン					
Pair-fed 対照群	1.21 ± 0.07 (n = 10)	no data	1.09 ± 0.07 (n = 10)	1.32 ± 0.18 (n = 3)	no data
V.B ₁₂ 欠乏群	2.49 ± 0.21* (n = 6)	no data	0.64 ± 0.02* (n = 7)	1.87 ± 0.06* (n = 3)	no data

実験条件は表2の下の説明に記載した。

数値は平均値 ± SEM で示した。

*Pair-fed 対照群とビタミンB₁₂欠乏群との間で Student の *t* 検定を行った結果、有意差 ($p < 0.05$) が認められたことを示す。

¹ この表ではビタミンB₆と表記したが、4-ピリドキシン酸の量である。4-ピリドキシン酸は尿中に排泄される主要なビタミンB₆の異化代謝産物である。

² この表ではニコチンアミドと表記したが、ニコチンアミドとその異化代謝産物であるN¹-メチルニコチンアミド、N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミドの合計量である。

は表4に示した。

1. ビタミンB₁₂含量

予測されたように、ビタミンB₁₂欠乏ラットの方が対照ラットよりも有意に低い値を示した。肝臓中のビタミンB₁₂含量の低下は1/3程度であったが、尿中の排泄量の低下はより顕著であり、特に、雄ラットでは1/45にまで低下していた。

2. ビタミンB₁含量

雄ラットにおいても、雌ラットにおいても、ビタミンB₁₂欠乏により、尿中、肝臓中、腎臓中のビタミンB₁含量が有意に低値を示した。この結果は、Nishino と Itokawa⁴⁾の報告と一致する。

3. ビタミンB₂含量

ビタミンB₂含量は、全くビタミンB₁₂欠乏の影響を受けなかった。

4. ビタミンB₆含量

ビタミンB₆含量に関して、肝臓における含量は両群間でほとんど同じであったが、ビタミンB₁₂欠乏ラットでは、尿における排泄量は対照ラットよりも低かったが、腎臓においては高い値を示した。

5. ニコチンアミド含量

ニコチンアミド含量は、全くビタミンB₁₂欠乏の影響を受けなかった。

6. パントテン酸含量

パントテン酸含量は、全くビタミン B₁₂ 欠乏の影響を受けなかった。

7. 葉酸含量

ビタミン B₁₂ 欠乏により、尿中、肝臓中、腎臓中の葉酸含量が有意に低値を示した。

8. ビオチン含量

ビタミン B₁₂ 欠乏がビオチン含量におよぼす影響は複雑であった。尿中への排泄量はビタミン B₁₂ 欠乏により有意に増大し、腎臓中の含量も有意に高い値を示した。ところが、肝臓中のビオチン含量はビタミン B₁₂ 欠乏により低値を示した。

文 献

- 1) Mattevi A, Obmolova G, Schulze E, Kalk KH, Westphal AH, de Kok A, Hol WG. (1992) Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science* **255**, 1544-1550
- 2) Varela-Moreiras G, Murphy MM, Scott JM. (2009) Cobalamin, folic acid, and homocysteine. *Nutr Rev* **67 Suppl 1**, S69-72
- 3) 守谷彩, 福渡努, 柴田克己 (2009) 精製飼料を投与した Wistar 系ラットの栄養パラメーター. *ビタミン* **83**, 612-617
- 4) Nishino K, Itokawa Y (1977) Thiamin metabolism in vitamin B6 or vitamin B₁₂ deficient rats. *J Nutr* **107**, 775-782

謝 辞

本資料は、平成 19 年度～21 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)の成果の一部である。関係各位に謝意を表する。

(平成 21.11.13 受付)

地域在住の女性後期高齢者における 血中ビタミンD濃度と転倒発生に関する縦断研究

鈴木隆雄¹⁾ 島田裕之¹⁾ 清水容子²⁾
金 憲経²⁾ 吉田英世²⁾

はじめに

一般に、加齢とともに皮膚でのビタミンD産生能は低下し¹⁾、血中ビタミンD濃度は低下する。われわれの先行研究²⁾でも、65歳以上の地域在宅女性で年齢とともに血清25(OH)D濃度が低下していた。血中ビタミンDの不足は、骨量減少を助長し、骨粗鬆症の進行およびそれに伴う大腿骨頸部骨折の受傷可能性を増大させる重要な原因と考えられる。同時にわれわれの先に行った65歳以上の地域在宅高齢者2,957名の横断研究では、血清25(OH)D濃度が低い群で運動機能、特に筋力、バランス能力、および歩行速度が有意に低く、転倒と有意に関連していたと報告した²⁾。

本研究では、女性の地域在宅高齢者、中でも虚弱あるいは要介護状態に至る割合の高い75歳以上の後期高齢者を対象として、血中ビタミンD濃度として血清25(OH)D濃度を測定し、血清25(OH)D濃度と転倒発生との関連性について縦断的追跡研究を行い、両者の関連性を明らかにすることを目的とした。

1 対象と方法

1) 研究対象者の選定

本研究の対象者は、東京都板橋区に在住する75歳以上の高齢女性である。

初回調査として、2008年10月～11月に実施された健診に対し、合計1,399名が受診した。さらに2009年11月に追跡郵送調査を行い、過去1年間の転倒経験を含む健康状況が把握できた1,393名を本研究の追跡対象とした。健診については高齢者に特有の老年症候群のリスク把握と予防のための健診(「お達者健診」)であり、このようなモデル的検診に関する詳細は他の多くの論文に記載されている³⁾。転倒の把握については、初回調査の健診時の聞き取り、および追跡調査時の郵送調査共に、「ここおよそ1年間に転んだことはありますか(転びそうになった、転びかけた、交通事故などはのぞきます)」という設問に対して「ある」と回答した場合を「転倒あり」とした。

なお本研究は、東京都健康長寿医療センターの倫理委員会の審査を得て実施した。2008年のベースライン健診時に、受診者に健康情報の研究への使用に関して説明し、書面にて同意署名を得た。

Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Fall Risk among Japanese Community-Dwelling Elderly Women Aged 75 Years or Older

Takao Suzuki : Research Institute, National Center for Geriatrics and Gerontology, *et al.*

Key words : Serum 25-hydroxyvitamin D, Falls, Elderly women

¹⁾ 国立長寿医療研究センター研究所 ²⁾ 東京都健康長寿医療センター研究所 自立促進と介護予防研究チーム

表1 対象者の特性の推移(女性, n = 1285)

項目	2008年健診	2009年追跡調査	p値
年齢(歳) 平均値±標準偏差(範囲)	78.6±2.8(75~90) (n = 1,285)		
年齢階級(歳)			
75~79	809名(63.0%)		
80~84	456名(35.5%)		
85~90	20名(1.6%)		
健康度自己評価(健康である)	1,074名(83.6%) (n = 1,285)	1,005名(78.5%) (n = 1,280)	p = 0.001 ¹⁾
過去1年間の転倒あり	241名(18.8%) (n = 1,285)	312名(24.4%) (n = 1,277)	p < 0.001 ¹⁾
転倒回数			
1回	181名(75.1%)	153名(49.0%)	p < 0.001 ¹⁾
2回以上	60名(24.9%)	146名(46.8%)	
不明	0名(0%)	13名(4.2%)	

データ数(n)は項目により異なる。¹⁾: χ^2 検定

表2 ベースライン健診項目からみた追跡1年間の転倒発生のリスク

ベースライン健診項目	追跡1年間の転倒者数(割合)	オッズ比 ¹⁾	95%信頼区間	p値
年齢	75~79歳(n = 804) 177(22.0%)	1.42	1.09~1.84	0.009
	80歳≤(n = 473) 135(28.5%)			
アルブミン	4.3g/dL≤(n = 657) 143(21.8%)	1.32	1.02~1.70	0.037
	4.3g/dL>(n = 614) 168(27.4%)			
握力	19kg≤(n = 626) 123(19.6%)	1.60	1.23~2.10	0.001
	19kg>(n = 586) 169(28.8%)			
5m通常歩行時間	3.9秒>(n = 593) 123(20.7%)	1.37	1.05~1.79	0.019
	3.9秒≤(n = 682) 188(27.6%)			
開眼片足立ち時間	16秒≤(n = 652) 128(19.6%)	1.61	1.24~2.10	<0.001
	16秒>(n = 621) 182(29.3%)			
健康度自己評価	健康である(n = 1,067) 237(22.2%)	1.91	1.39~2.62	<0.001
	健康でない(n = 210) 75(35.7%)			
過去1年間の転倒経験	なし(n = 1,039) 196(18.9%)	4.11	3.04~5.54	<0.001
	あり(n = 238) 116(48.7%)			

¹⁾: 年齢以外のベースライン健診項目については、Mantel-Haenszel検定により年齢(2層化)調整したオッズ比を算出。

2) 解析対象者の選定

追跡郵送調査で最終的に回答のあった1,285名(回収率92.2%)を、本研究の解析対象者とした。統計解析は、統計解析用ソフトウェアSPSS15.0を用いた。統計学的有意水準は5%(p = 0.05)とした。

2 結果

1) 対象者の特性の推移(表1)

対象者の年齢は、75歳以上90歳以下、平均78.6±2.8歳(平均値±標準偏差)であった。ベースライン健診(2008年)と1年後の追跡調査における対象者の特性の推移をみた結果、健康度

表3 25(OH)Dの分布とintact PTHとの関係

	年齢階級(歳)		全体 (n = 1,279)	intact PTH (pg/mL) ³⁾ (n = 1,279)
	75~79 (n = 808)	80~90 (n = 471)		
25(OH)D ¹⁾ (ng/mL) 平均値±標準偏差(範囲)	22.3±6.7 (6~81)	21.8±6.8 (6~48)	22.1±6.7 (6~81)	
三分位				
≤19(低値群) ²⁾ : ビタミンD不足(20ng/mL未満)	271名 (33.5%)	179名 (38.0%)	450名 (35.2%)	45.5±0.8
20~24(中間値群)	264名 (32.7%)	140名 (29.7%)	404名 (31.6%)	42.0±0.8
25≤(高値群)	273名 (33.8%)	152名 (32.3%)	425名 (33.2%)	38.3±0.8*

¹⁾: 年齢階級間のt検定にて有意な差なし($p=0.05$)。 ²⁾: 年齢階級間の χ^2 検定にて有意な差なし($p=0.05$)。 ³⁾: 分散分析(年齢調整)後の平均値±標準誤差。*: p for trend < 0.001

自己評価で「健康である」と回答した割合は有意に低下していた。過去1年間の転倒経験は、18.8%から24.4%と有意に増加していた。転倒経験者のうち複数回転倒する割合は、24.9%から46.8%と有意に増加していた。

2) ベースライン健診項目からみた追跡1年間の転倒発生リスク(表2)

ベースライン健診項目ごとに対象者を2群に分割し、追跡1年間の転倒発生リスクを年齢調整して算出した。アルブミンと運動機能検査項目については、中央値で2群に分割した。追跡1年間の転倒発生リスクは、年齢80歳以上では80歳未満に比較して1.42倍、有意に高かった。アルブミン4.3g/dL未満では4.3g/dL以上に比較して1.32倍、握力19kg未満では19kg以上に比較して1.60倍、5m通常歩行時間3.9秒以上では3.9秒未満に比較して1.37倍、開眼片足立ち時間16秒未満では16秒以上に比較して1.61倍、健康度自己評価で「健康でない」と回答した群は「健康である」群に比較して1.91倍、有意に転倒発生リスクが高かった。ベースラインから過去1年間に転倒経験のある群は、ない群に比較して4.11倍、有意に転倒発生リスクが高かった。

3) 25(OH)Dの分布とintact PTHとの関係(表3)

25(OH)Dの平均値は22.1±6.7ng/mLで、二つの年齢階級間で平均値に有意な差を認めなかった。25(OH)Dの分布を三分位に分割すると、19ng/mL以下の低値群は35.2%であり、20ng/mL未満(19ng/mL以下)をビタミンD不足とすると、ビタミンD不足者の割合は35.2%であった。ビタミンD不足の割合は年齢階級別では33.5%と38.0%と高年齢層で高かったが、有意な差ではなかった。三分割した各群のintact PTHの平均値(年齢調整)は、25(OH)Dが高くなるほど有意に低くなった(p for trend < 0.001)。

4) 25(OH)D濃度の追跡1年間の転倒発生へのリスク

25(OH)Dの分布で三分位に分割し、高値群(25ng/mL以上)に対する中間値群(20~24ng/mL)、低値群(19ng/mL以下: ビタミンD不足群)の追跡1年間の転倒リスクを、多重ロジスティックモデル(年齢調整)で解析した。転倒を1回以上発生するリスクは、25(OH)Dが低くなるほど有意に高くなり、低値群(ビタミンD不足群)は高値群に対して1.56倍と有意にリスクが高かった。また転倒を2回以上発生するリス