

平成 16 年度厚生労働科学研究費(循環器疾患等総合研究事業)
日本人の食事摂取基準(栄養所要量)の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅱ. 主任研究者の報告書

11. 加齢に伴うビタミン代謝に関する研究 ーラットにおける影響ー

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

近年、日本の平均寿命は延び続け、わが国は高齢化社会を迎えている。そのため高齢者の栄養状態の維持も重要な課題となってきた。そこで本研究はラットを長期間飼育し、加齢とビタミン代謝との関わりを調べた。その結果、尿中のビタミン B₁、ビタミン B₆ 排泄量は加齢にかかわらず一定の傾向を示し、ビタミン B₂ は若干の増加傾向はあるが、加齢による変化はなかった。一方、尿中パントテン酸排泄量は加齢に伴い増加傾向を示した。尿中ニコチンアミド排泄量は週齢が増加するにつれて減少する傾向を示した。よって、ニコチンアミドは加齢に伴い摂取量を増加させることが望ましく、ビタミン B₆ は週齢にかかわらず一定の摂取量で良い可能性が出てきた。パントテン酸は、週齢を増すごとに摂取量を減らしていてもよい可能性が示唆された。

A. 目的

第六次改定の日本人の栄養所要量-食事摂取基準-におけるナイアシン量は、高齢者のスポット尿の測定データを基準に決定されている¹⁾。しかし、体温、血圧、成長ホルモン、副腎皮質ホルモンの分泌などにより、生体内環境はおおよそ24時間の周期で絶えず変化しており、スポット尿では、尿を採取する時間によって各尿中排泄量にも違いが生じる。そこで、24時間尿を採取し、一日の尿中排泄量を測定する必要があるが、何人もの高齢者の24時間尿を採取し、なおかつ各栄養素量の決まっている食事を摂取して頂くこと、あるいは正確に食事調査を実施することは非常に困難である。

そこで、24時間尿を簡便に採取でき、飼料を自由に与えることのできるラットを対象動物として本実験を行った。本実験は、ラットを1年6ヶ月と長期間に渡って飼育し高齢ラットを作成しながら、定期的に24時間尿を採取し、加齢とビタミン代謝との関わりを調べることを目的として行ったものである。ラットの寿命は最大で約3年であり、ヒトの最大寿命を120歳とすると、本実験の解剖日におけるラットの歳は、ヒトの約60歳にあたるといえる。数あるビタミンの中でも生体内でトリプトファン(Trp)から作られるほど重要であるニコチンアミド(Nam)と²⁾、同じ水溶性ビタミンであるビタミンB₁(VB₁)、ビタミンB₂(VB₂)、ビタミンB₆(VB₆)、パントテン酸(PaA)に焦点を当てた。

B. 実験方法

1. 試薬

飼料に使用したカゼイン、L-メチオニン、 α -コングスターチは和光純薬工業(株)より購入した。ミネラル混合(AIN93-M 配合)、ビタミン混合(AIN93 配合)はオリエンタル酵母工業(株)より購入した。

尿中代謝産物の定量用標準品として使用したN¹-メチルニコチンアミド(MNA)は東京化成工業(株)より、ニコチンアミド、ビタミンB₁、ビタミンB₂、4-ピリドキシン酸(4-PIC)は和光純薬工業(株)より購入した。パントテン酸定量用基礎培地は日水製薬(株)より購入した。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(2-Py)は、柴田ら³⁾の方法で合成し用いた。

2. 動物の飼育方法

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会で承認を受けた。動物室の温度は20℃前後、湿度は50%前後、明暗サイクルは6時から18時までを明、18時から6時までを暗とした。

2.1 実験

3週齢のWistar系雄ラット25匹を日本クレア株式会社より購入し、飼育開始3ヶ月間はラット用代謝ケージに、3ヶ月以降は長方形型の代謝ケージに入れ、計1年6ヶ月間に渡って飼育した。飼料はNiA-Free 20%カゼイン食(表1)であり、水ともに自由摂取させた。2~3日ごとに飼料、水の交換と、飼料摂取量・体重量の測定を行った。定期的に24時間尿の採尿を行い、尿は使用するまで塩酸酸性下、-20℃で保存した。最終日の採尿終了後ラットを屠殺し、血液を採取し、肝臓を摘出した。各臓器重量を測定し、尿は代謝産物の測定に使用した。

3. 分析方法⁽⁴⁾

MNAの定量は強アルカリ性下でアセトフェノンと縮合させることにより蛍光物質に変換し、これをHPLCにて測定した。

Nam, 2-Py, および4-Pyの定量には、尿の炭酸カリウムを飽和量加えた後、ジエチルエーテルで抽出し、乾固させた抽出液を水に溶解したものをHPLCにて測定した。

VB₁、VB₂、VB₆、VCの定量は、0.45 μ mのマイクロフィルターでろ過し、HPLCにて測定した。PaAの定量は、*Lactobacillus plantarum* (旧 *arabinosus*) 17-5, ATCC 8014 を使用し生化学的定量法で測定した。

C. 結果

1. 体重量および飼料摂取量

体重増加量はDay 150あたりから徐々に緩やかになり、解剖時には約700gであった(図1)。飼料摂取量はDay 50あたりから一定になりはじめ、以降一日約20gであった(図1)。25匹の飼育から開始したが、途中、後ろ足付け根部分に脂肪の塊である“こぶ”が付き、日増しに肥大し、体重が減少していつて死亡するラットが数匹いた。解剖日の77週齢には20匹に減少したが、これらは最後まで体重が減少することもなく、肉眼的な所見では

異常は認められなかった。

2. 肝臓中のビタミン量

77 週齢のラットの肝臓中のビタミン B₁, ビタミン B₂, ビタミン B₆, 総ニコチンアミド, パントテン酸および NAD 含量を表 2 に示した。

3. 尿中排泄量—Nam—

図 2 に尿中 Nam と Nam 異化代謝産物量の合計量 SUM を示した。飼料摂取量が一定となった 11 週齢から示した。Nam は体内で異化代謝されて尿中に出てくる特種なビタミンであり, Nam から MNA という代謝産物を経て 2-Py, 4-Py となりそれぞれが尿中に排泄される^{5),6)}。SUM とはこの Nam, MNA, 2-Py, 4-Py の合計量であり, 排泄量は週齢が増加するにつれて減少する傾向を示した。

4. 尿中排泄量—VB₁, VB₂, VB₆ の異化代謝産物 4-PIC, PaA

図 3 に結果を示した。尿中 VB₁, 4-PIC (4-ピリドキシン酸) 排泄量は加齢にかかわらず一定の傾向を示し, VB₂ は若干の増加傾向が認められたが, 加齢による変化はないと判断した。一方, 尿中 PaA 排泄量は加齢に伴い増加傾向を示した。

D. 考察

1. 体重および飼料摂取量

飼育最終日まで生存した 25 匹中 20 匹は最後まで体重が減少することなく, 肉眼的所見において, 異常は認められなかった。

2. 肝臓中ビタミン量

肝臓中 VB₁, VB₂ 濃度は, 若年期と比較して若干低い値を示した。Nam 濃度も若年期と大差なかったことから, 体内で最重要ビタミンは老化しても低下しないよう, 調節が厳密にされていると考えられた。

4. 尿中排泄量—Nam

肝臓中 Nam 濃度は加齢にかかわらず一定であったことから, 尿中 SUM 排泄量が減少したことにより, 体内での Nam 必要量が増加したと考えられる。よって, 加齢に伴い Nam の摂取量を増加させることが望ましいかもしれない。

5. 尿中排泄量—VB₁, VB₂, VB₆, PaA

VB₁, VB₂ に関して肝臓中濃度は若年期と比較して若干低かった。飼料摂取量は一定で尿中排泄量も一定であることから, 減少分は糞中に排泄された以外に考えられないが, そうすると生体利用率が低下したことになり, 吸収率は逆に上昇したことになる。

一方, 尿中 PaA 排泄量は, 肝臓中濃度が一

定であったことから, 加齢に伴って必要量は減少したものと考えられる。PaA は, 脂質代謝に関わるビタミンであり, 若年期には脂質代謝が盛んに行われる。そのため, 若年期には排泄量が少なく, 加齢によって脂質代謝が低下するために排泄量が増加したと思われる。

よって, ラットにおいて VB₆ 代謝は, 11 週齢からは加齢による変化はないと考えられ, 週齢にかかわらず一定量を摂取していればよいと言える。PaA は加齢に伴い必要量が減少することから, 週齢を増すごとに, 摂取量を減らしていてもよい可能性が考えられる。VB₁, VB₂ に関しては, さらなる研究が必要である。

E. 結論

ラットを長期間飼育することによって高齢者モデルを作成し, 加齢とビタミン代謝との関係について研究を行った結果, Nam は加齢に伴い摂取量を増加させることが望ましく, VB₆ は週齢にかかわらず一定の摂取量で良い可能性が出てきた。PaA は, 週齢を増すごとに摂取量を減らしていてもよい可能性がある。

F. 健康危険情報

特記する情報はない。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 引用文献

1. Shibata K, Sanada H, Yuyamam S, Suzuki, T (1994) Evaluation of Niacin Nutrition in Persons of Advanced Age Supposed by the Urinary Excretion of Niacin Metabolites. *Vitamins*, 68:365-372.
2. Horwitt MK, Harvey CC, Rothwell WS, Cutler JL, Haffron D, (1956) Tryptophan-niacin relationships in man. Studies with diets deficient in riboflavin and niacin, together with observations on the excretion of nitrogen and niacin metabolites. *J Nutr*, 60 (Supl.1), 1-43.

3. Shibata K, Kawada T, Iwai K. (1988) 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.
4. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金, 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業, 日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究, 平成 15 年度 総括・分担研究所報告書, 主任研究者柴田克己, 平成 16 (2004) 年 4 月.
5. Shibata K, Matsuo H, (1989) Effect of gradually increasing levels of nicotinamide in a niacin-free and tryptophan-limiting diet on the blood NAD levels and the urinary excretion of nicotinamide metabolites in rats. *Agric Biol Chem*, 53:1333-1336 .
6. Shibata K, Matsuo H, (1989) Correlation between niacin equivalent intake and urinary excretion of its metabolites, N¹-methylnicotinamide, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, and N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, in humans consuming a self-selected food. *Am J Clin Nutr*, 50:114-119.

表 1. 飼料組成 (%)

	(%)
Milk Casein (Vitamin-free)	20
L-Methionine	0.2
Gelatinized-Corn starch	45.8
Sucrose	23
Corn oil	5
Mineral mixture (AIN-93-M)	5
Vitamin mixture (NiA-free) (AIN-93)	1

表 2. 77 週齢の肝臓中のビタミン含量

ビタミン名	値 (nmol/g 肝臓)
ビタミン B ₁	24 ± 4
ビタミン B ₂	65 ± 9
ビタミン B ₆	20 ± 6
パントテン酸	455 ± 57
総ニコチンアミド	1160 ± 305
NAD	797 ± 117

値は平均値 ± SD (n = 20) で示した.

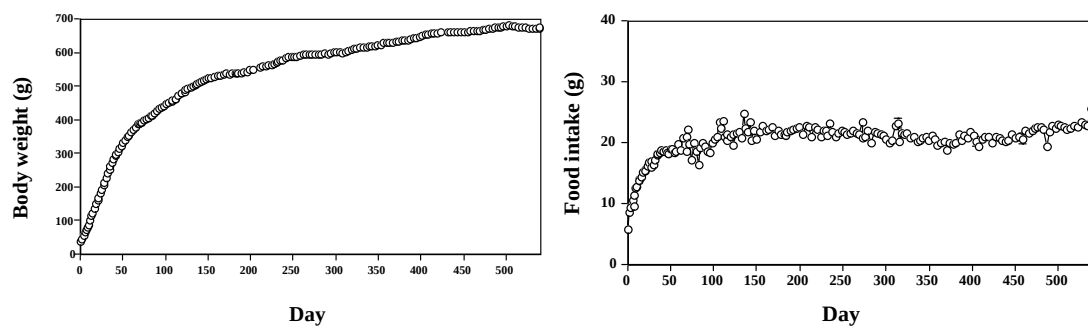


図1. 体重及び飼料摂取量の変動

尿中へのニコチンアミド異化代謝産物の排泄量
($\mu\text{mol/g of diet}$)

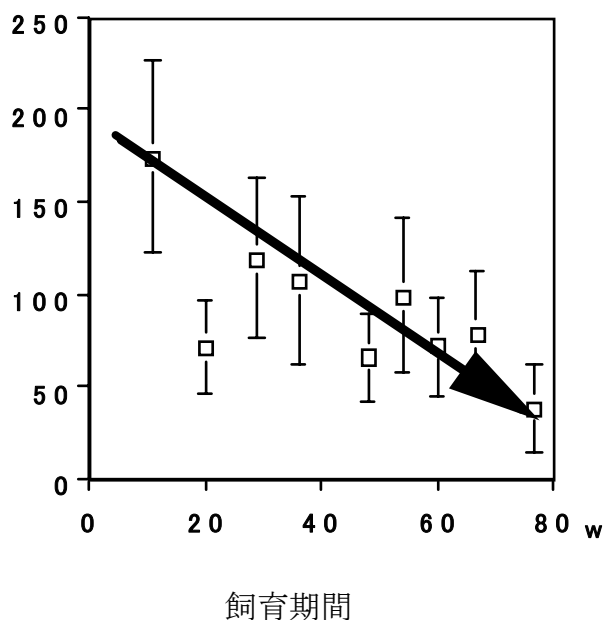


図2. 尿中へのニコチンアミド異化代謝産物の排泄量の変動

ニコチンアミド異化代謝産物 = ニコチンアミド + MNA + 2-Py + 4-Py

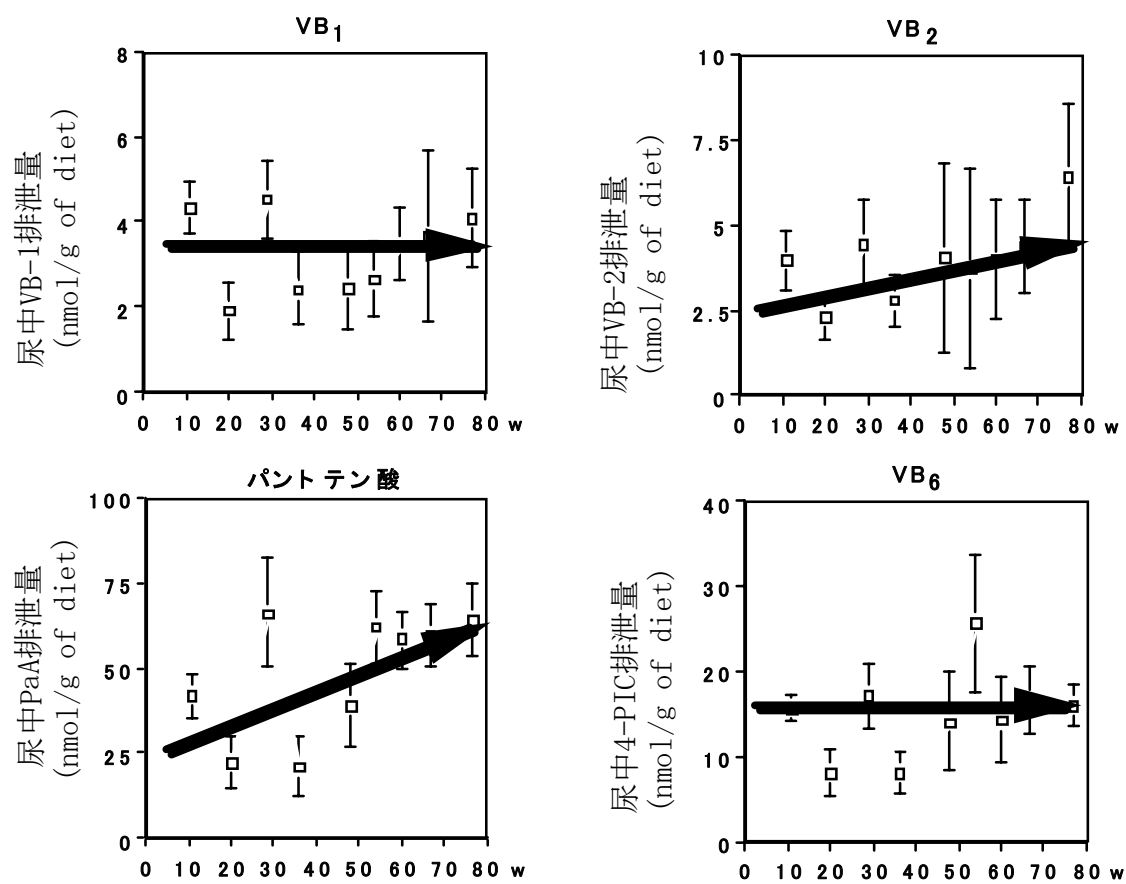


図3. 尿中へのビタミン B₁, ビタミン B₂, パントテン酸及びビタミン B₆ の異化代謝産物の 4-PIC 排泄量の変動