

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

Ⅲ. 分担研究者の報告書

3. 高たんぱく質食摂取下における若齢および成熟ラットのビタミン B₆ 栄養について

分担研究者 早川 享志 岐阜大学 教授

研究要旨

ビタミン B₆ は、6-11 か月の乳幼児では 0-5 か月の乳幼児の AI と成人の食事摂取基準からの外挿値の平均値として求めているが、両者は大きく異なっている。また、ビタミン B₆ の所要量は、たんぱく質あたりのビタミン B₆ 必要量をもとに計算されることになったが、一般に成長期では成熟期よりもたんぱく質の必要量が高い。また、成熟期に比べて成長期においては、たんぱく質も異化よりも同化による利用が大きく、成長期におけるたんぱく質摂取量あたりで算定したビタミン B₆ 食事摂取基準は、成熟期よりも高く見積もられる可能性がある。そこで、本研究においては、4 週齢の若齢ラットと 16 週齢の成熟ラットをそれぞれ成長期と成熟期と考え、それらのラットに高たんぱく食を摂取させた場合のビタミン B₆ 栄養状態について評価することにより、成長期におけるビタミン B₆ 食事摂取基準の妥当性について検討した。その結果、高たんぱく食（たんぱく質摂取量あたりのビタミン B₆ 摂取量は同じである）を摂取した場合、ビタミン B₆ 栄養状態の指標である血漿のビタミン B₆ レベルは、有意差な差はなかったが、若齢ラットの方が高値であった。また、クレアチニン当たりの 4-ピリドキシン酸排泄量は、若齢ラットの方が高い傾向があった。従って、たんぱく質必要量の高い成長期においては、たんぱく質摂取量あたりで算定したビタミン B₆ 食事摂取基準は、高めに算定されている可能性があると考えられた。

A. 目的

ビタミンB₆の食事摂取基準は、6-11ヶ月乳幼児では、0-5ヶ月乳幼児からの外挿値と大人からの外挿値の平均値として求められているが、両者の値は隔たっている。このようにビタミンB₆の食事摂取基準はまだ曖昧な部分が残されている。ビタミンB₆の食事摂取基準は、たんぱく質摂取量あたりで策定されているが、たんぱく質の代謝を考えると同化による利用は、成長期に盛んであるのに対して、大人では成長期と比較して異化代謝に利用される割合が高いと考えられる。ビタミンB₆の必要量は、たんぱく質摂取量が増すと増加する¹⁾ことがたんぱく質摂取量あたりでビタミンB₆の食事摂取基準を策定する根拠をサポートしているが、成長期と成熟期でのたんぱく質代謝の違いがビタミンB₆の食事摂取基準にも影響を及ぼす可能性が考えられる。すなわち同じたんぱく質摂取レベルにおいて必要とされるビタミンB₆必要量に違いがある可能性が考えられる。

ビタミンB₆の栄養評価は、中長期的には血漿のビタミンB₆レベルにより判定される²⁾。一方、過剰なビタミンB₆は尿中に排泄され、一部は4-ピリドキシニン酸として排泄される³⁾。従って、体内ビタミンB₆栄養指標として血漿のビタミンB₆レベルを、ビタミンB₆の代謝指標として尿中ビタミンB₆関連物質排泄量を測定することによりビタミンB₆栄養状態の比較が可能ではないかと考え、週齢の異なるラットにおいて高たんぱく質摂取時のビタミンB₆栄養について調べることにより成長期と成熟期でのたんぱく質代謝状態の違いがビタミンB₆栄養に及ぼす影響について検討することとした。

B. 実験方法

1. 動物実験法

実験動物は4週齢(体重80~100g)および15週齢(体重360~380g)のWistar/ST系Clean雄ラットを日本エスエルシー株式会社より購入した。15週齢のラットは16週齢(平均体重382±3g)までポリカーボネート製のケージで飼育(飼料:オリエンタル酵母工業株式会社製MF食)後、実験に使用した。

予備飼育にはAIN-76TM標準飼料を用い、本

飼育では表1に示した飼料組成に従いカゼイン含量を60%に調製した飼料を用いた。飼料成分であるカゼイン、AIN-76TMミネラル混合、セルロースパウダーはオリエンタル酵母工業株式会社より、重酒石酸コリンは和光純薬工業株式会社より、Retinol acetateはSigma社より、その他はすべてナカライテスク株式会社より購入した。

ラットは5連の個別ケージに入れ、実験環境に慣らすためにAIN-76TM標準飼料で3日間予備飼育した。予備飼育後、4週齢のラットを若齢群、16週齢のラットを成熟群とし、各群7匹からなる2群を設けた。各群に実験飼料を与え、26日間飼育した。飼育期間中、飲料水(水道水)、実験飼料は自由摂取とし、毎日体重と飼料摂取量を測定した。飼育室の温度は23±1°Cに設定し、明暗12時間サイクル(6:00~18:00)とした。また、飼育開始4週目に24時間尿および24時間糞を採取し、分析まで-20°Cで保存した。尿については尿量、クレアチニン量および4-ピリドキシニン酸量を、糞については凍結乾燥後、重量を測定しMILLSER(FOODS MILL, Iwatani)で粉碎後、総ビタミンB₆含量測定に供した。

本飼育開始から27日目にエーテル麻酔下で解剖を行った。採血は1%ヘパリンNa処理したシリンジと注射針を用い、開腹後、腹部大動脈より行った。採取した血液は15分間遠心分離(1,500×g, 4°C)し、血漿サンプルを得た。また、摘出した肝臓は重量を測定後、血漿サンプルとともに分析まで-20°Cで凍結保存した。

2. 血漿および肝臓中B₆ビタマーおよび尿中ピリドキシニン酸の分析

血漿および肝臓中のB₆ビタマーは柘植らの方法⁴⁾に従いHPLCにより分析した。PLPについては、抽出液をシアン化カリウム(KCN)処理により4-ピリドキシニン酸5'-リン酸(PIC-P)に変換後高感度で分析する柘植の方法⁵⁾を用いた。尿中の4-ピリドキシニン酸(PIC)は、GregoryとKirkの方法³⁾により分析した。

3. 微生物定量法による尿中および糞中総ビタミンB₆量の測定

4週目に回収した尿は、1500×g, 4°Cで10分間遠心分離しその上清を-20°Cで保存した。この尿サンプルは0.055 M HCl下

121°Cで4時間オートクレーブすることにより加水分解処理を行い pH 5.0 に調整したものを *Saccharomyces cerevisiae* 4228 (ATCC 9080)を使用した微生物定量法に供した⁶⁾。粉碎糞についても 0.055 M 塩酸下 121°Cで5時間オートクレーブを行いビタミン B₆を抽出後、pH5.0 に調整し尿と同様に微生物定量法に供した。

4. その他の分析法

尿中クレアチニンは、Wehstein & Gudaitisの方法⁷⁾により分析した。

5. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差 (SE) であらわし、Student の t-test により危険率5%にて有意性を判定した。

C. 結果

実験期間中の最終体重、体重増加量、総飼料摂取量、飼料効率を表2に示した。最終体重、総飼料摂取量は成熟群に比べ若齢群で有意に低値となった。体重増加量は若齢群で有意に高く、成熟群においては成長増加の鈍化が確認された。

血漿 PL および PLP 濃度を図1 (A) および 1 (B) に示した。有意な差ではなかったが、成熟群よりも若齢群で高値となった。一方、肝臓 PLP および PMP 含量を図2 (A) および 2 (B) に示した。PMP および PLP 含量は何れも、有意差はなかったが、成熟群で高値を示した。また、両群で PMP が PLP よりも高値を示した。

クレアチニン当たりの尿中 PIC 排泄量を図3に示した。クレアチニン当たりでは、尿中 PIC は若齢群で高い傾向であった。体重 100 g、1日当たりの尿総 B₆ 排泄量および糞総 B₆ 排泄量を図4に示した。体重 100 g、1日当たりの尿総 B₆ 排泄量および糞総 B₆ 排泄量は有意な差は認められなかった。

D. 考察

ビタミン B₆ の食事摂取基準は、たんぱく質摂取量当たりで算定されている⁸⁾。今回用いた飼料は、カゼイン含量が60%と高いことから、ビタミン B₆ 栄養の立場からは厳しい飼料条件である。というのは、ビタミン B₆ の要求性は、摂取するたんぱく質の量に依存している⁹⁾ ことから、この飼料条件では、ビタミン B₆ 要求量自体が増加してい

ると考えられるからである。今回の実験においては、有意差は見られなかったが、血漿の PLP も PL も若齢群の方が高値であった。これとは対照的に肝臓においては有意差はないものの、成熟群の PLP および PMP 含量が若齢群よりも高値を示した。ビタミン B₆ は、PLP や PMP 補酵素としてアミノ酸代謝に関わっているので、成熟群での肝臓ビタミン B₆ レベルの増加は、この群におけるたんぱく質異化に関わるビタミン B₆ は動員が盛んになっている状況を示唆していると考えられる。今回の実験においては、ラット自体の大きさに違いがあるため、尿への PIC 排泄量は、クレアチニン当たりで表した。若齢群では、クレアチニン当たりの1日尿中 PIC 排泄量は高い傾向にあった。図には示していないが 100 g 体重当たりの場合も同様な傾向であった。尿中への総ビタミン B₆ 排泄量は 100 g 体重当たりの1日量として求めた。若齢群で数値が高かったが、有意な差は見られなかった。一方、100 g 体重当たりの1日量としての糞中の総ビタミン B₆ 排泄量も同様に若齢群で高めであったが、有意な差はなかった。糞 1 g 当たりの総ビタミン B₆ 含量は両群ともほぼ同じであった。通常の飼料の場合には、糞ビタミン B₆ 含量は腸内細菌がこのビタミンを産生しない限り変わらない結果が得られていることから¹⁰⁾、飼料由来のビタミン B₆ は、問題なく吸収されていると考えてよい。

以上のように、若齢群での血漿 PLP および PL レベル、クレアチニン当たりの尿中 PIC 排泄量、100 g 体重当たりの尿中総ビタミン B₆ 排泄量の全てが対照群よりも高い傾向にある結果から、若齢群の B₆ 必要量は成熟群よりも少ない可能性があり、今後この点を中心に検討を勧めたいと考えている。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

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. Okada M, Shibuya M, Akazawa T, Muya H, Murakami Y (1997) Dietary protein as a factor affecting vitamin B₆ requirement. *J Nutr Sci Vitaminol*, 44,37-45.
2. Lumeng L, Ryan PM, Li T (1978) Validation of the diagnostic value of plasma pyridoxal 5'-phosphate measurements in vitamin B₆ nutrition of the rat. *J Nutr*, 108, 545-553.
3. Gregory FJ, Kirk RJ (1979) Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*, 32, 879-883.
4. Tsuge H, Oda T, Miyata H (1986) Separation and determination of vitamin B₆ derivatives by reversed-phase HPLC. *Agric Biol Chem*, 50, 195-197.
5. Tsuge H, Toukairin-Oda T, Shoji T, Sakamoto E, Mori M, Suda H (1988) Fluorescence enhancement of PLP for application to HPLC. *Agric Boil Chem*, 52, 1083-1086.
6. 柘植治人, 早川享志: 第4章水溶性ビタミン4.5 ビタミンB₆(分担) “新・食品分析法” 日本食品科学工学会食品分析法編集委員会編, 光琳 394-406, 1996.
7. Wachstein M, Gudaitis A (1953) Disturbance of vitamin B₆ metabolism in pregnancy. (II) The influence of various amounts of pyridoxine-hydrochloride upon the abnormal tryptophan-load test. *J Lab Clin Med*, 42, 98-107.
8. Institute of Medicine (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press.
9. Hansen CM, Leklem JE, Miller LT (1996) Vitamin B-6 status of women with a constant intake of vitamin B-6 changes with three levels of dietary protein. *J Nutr*, 126, 1891-1901.
10. Hayakawa T, Iida Y, Tsuge H: (1999) Konjac mannan improves the vitamin B-6 status of rats fed a vitamin B-6-deficient diet., *Internat J Vit Nutr Res*, 69, 106-112.

表1. AIN-76TM標準飼料および実験飼料

Ingredients	AIN-76 TM diet	Experimental diet
	(%)	(%)
Casein	20.0	–
Vitamin-free casein	–	60.0
Soybean oil	5.0	5.0
Sucrose	50.0	12.4
Cellulose powder	5.0	2.0
AIN-76 TM vitamin mixture	1.0	1.0
AIN-76 TM mineral mixture	3.5	3.5
DL-Methionine	0.3	0.9
Choline bitartrate	0.2	0.2
α -Cornstarch	15.0	15.0

表2. 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量および飼料効率

	若齢群	成熟群
Final body weight (g)	306 ± 6	442 ± 10*
Body weight gain (g)	182 ± 6	59 ± 7*
Total food intake (g)	434 ± 13	485 ± 14*
Feed efficiency	0.421 ± 0.008	0.119 ± 0.012*

Values are means ± SE (n=7).

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

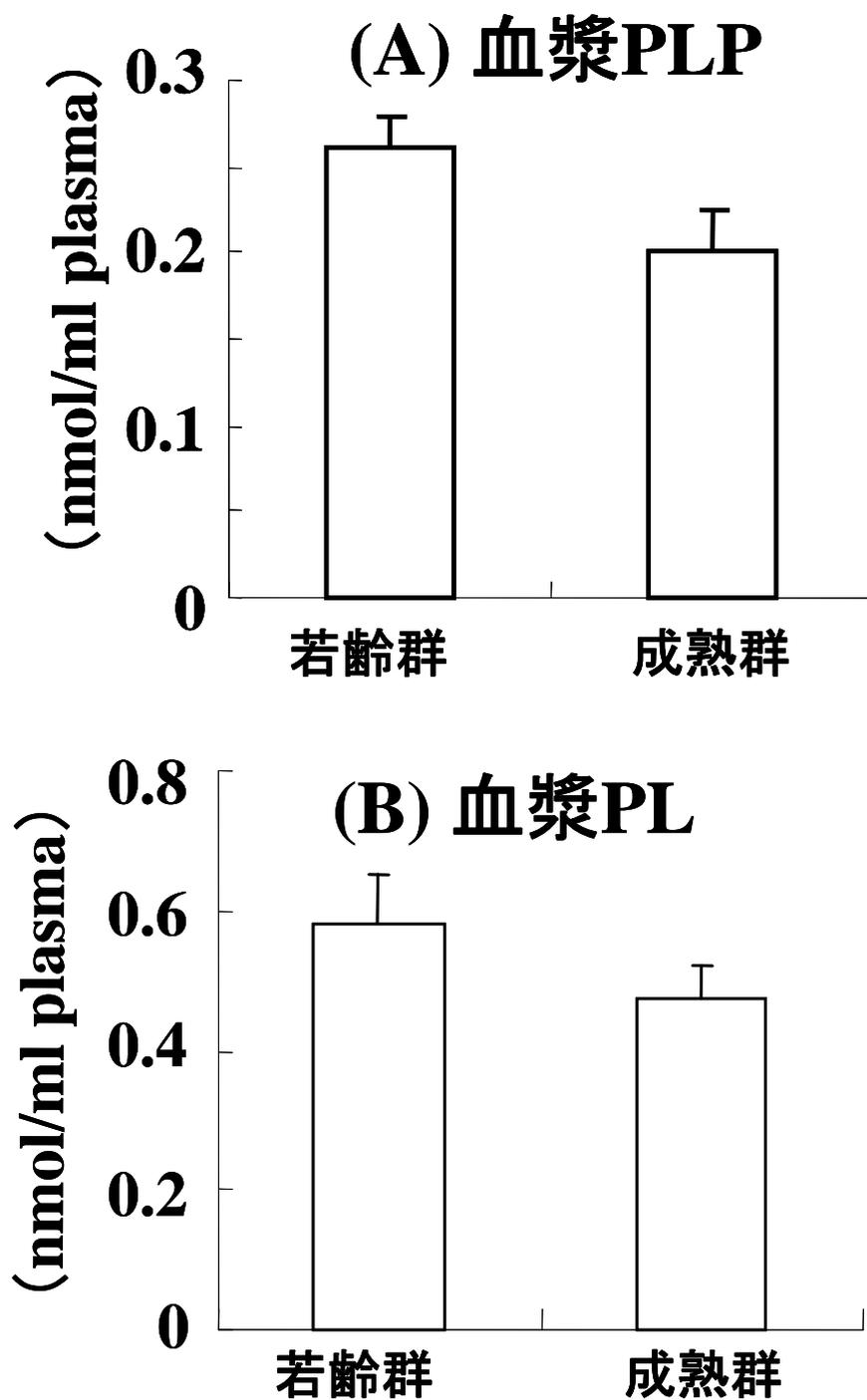


図1. ラット血漿中 PLP(A)および PL(B)濃度

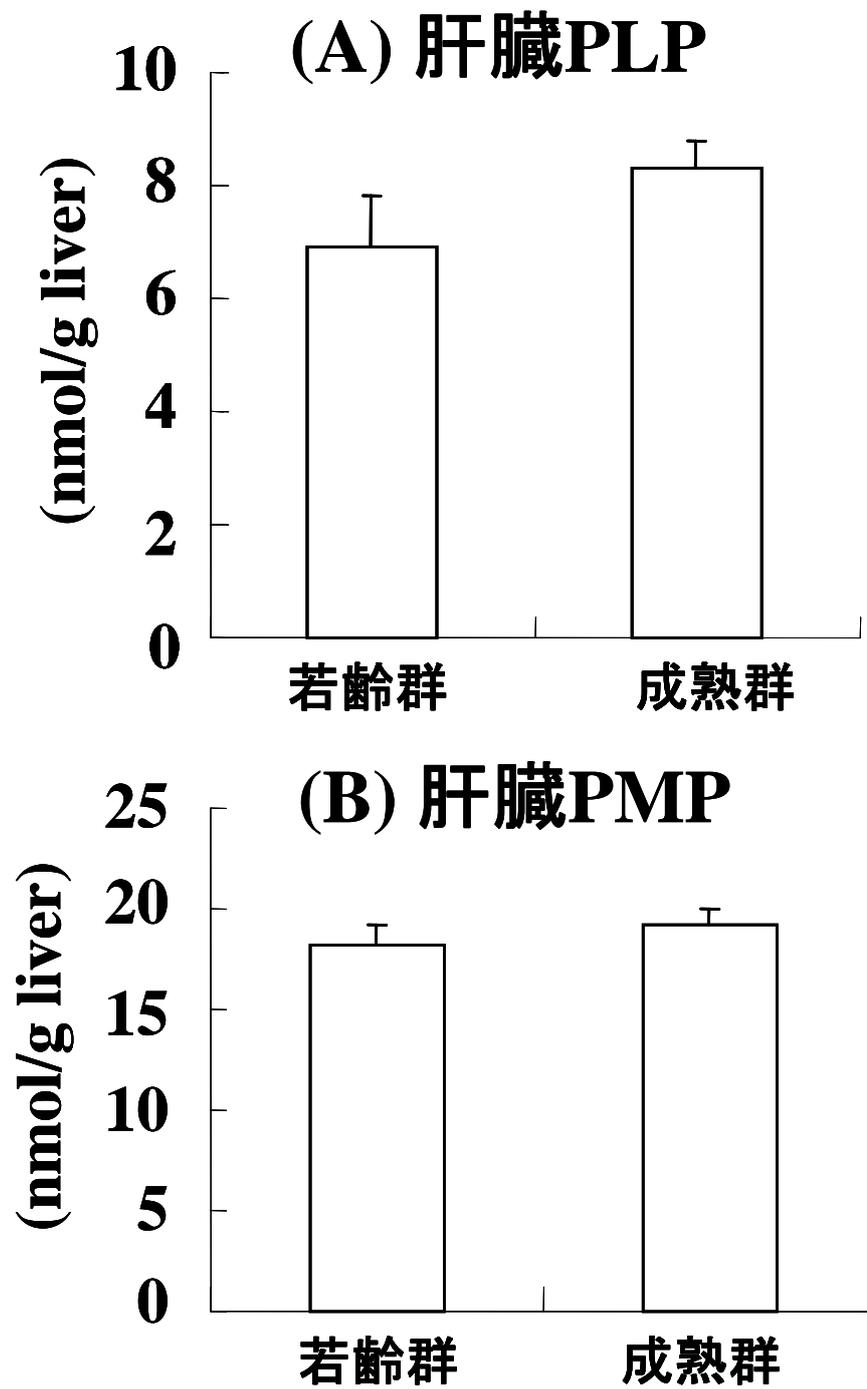


図2. ラット肝臓中 PLP(A)および PMP(B)含量

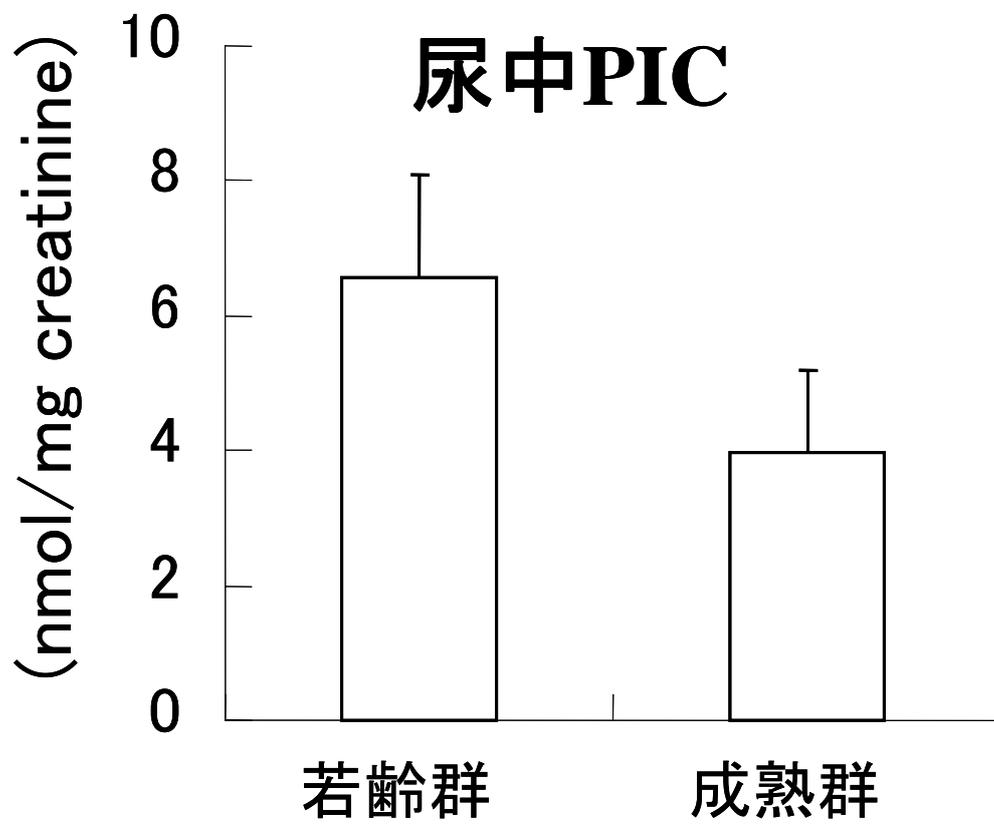


図3. ラット尿中PIC排泄量

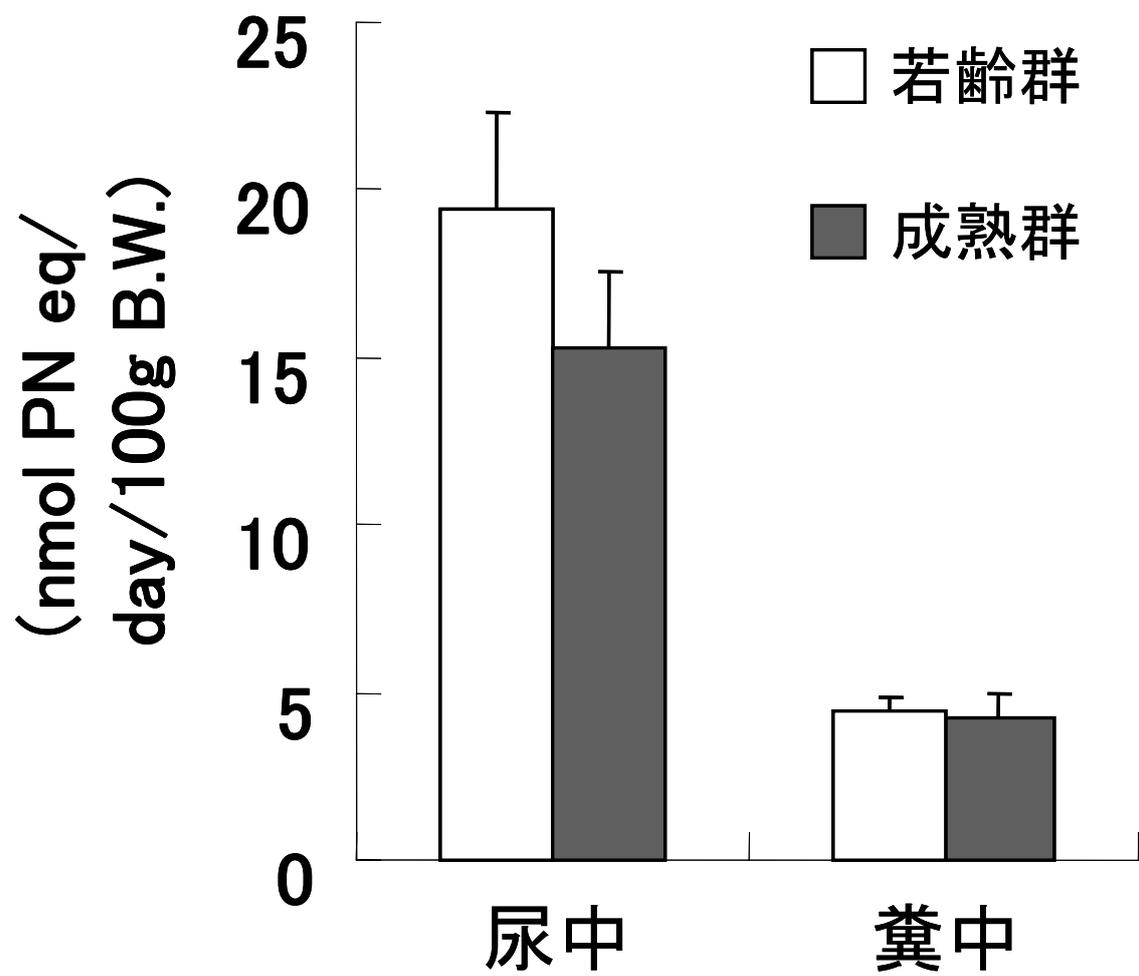


図4. ラット尿中および糞中総ビタミン B₆ 排泄量