

平成 17 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

7．ラットにおける脂質摂取量と尿中パントテン酸排泄量との関係

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

パントテン酸は、脂質代謝に深く関わっているが、パントテン酸の必要量が脂質の摂取量と相関するの否かに関する情報は乏しい。ラットを用いて、脂質摂取量と尿中に排泄されるパントテン酸量との関係を調べた。3週齢のWistar系雄ラットに20%カゼイン食にコーン油を5%添加したものを対照群とし、高脂肪食群として、コーン油を10%・20%・30%含む飼料を与え、28日間飼育した。その結果、尿中のパントテン酸排泄量は、コーン油の摂取量の増大にともなって有意に減少した。このことは、脂質摂取量の増加に伴いパントテン酸の必要量が高まったものと考えられた。

A. 目的

B 群ビタミンの一つであるパントテン酸は、補酵素である CoA やアシルキャリアー蛋白質の構成成分であり、さまざまな代謝に関与している。その中でも特に脂質代謝において重要な役割を担っている。しかし、脂質摂取量の増加に伴うパントテン酸の必要量は明らかになっていない。そこで、パントテン酸の栄養指標となるパントテン酸の尿中排泄量を調べ、脂質摂取量との関係を明らかにすることを目的とした。

また、B 群ビタミンは協調して、糖質、脂質、アミノ酸の代謝に関与し、補酵素として重要な役割を担うことが知られているため、他の B 群ビタミンの尿中排泄量も加えて測定することとした。

B. 研究方法

1. 試薬

ビタミンフリーミルクカゼイン、ショ糖、L-メチオニン は和光純薬工業（株）より購入した。α-コーンスターチ は日澱化学工業（株）より、コーンオイル は味の素（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）、セルロースパウダー はオリエンタル酵母工業（株）より購入した。

2. 動物飼育

本実験は滋賀県立大学実験動物委員会で承認を受けた。

飼育室の温度は 22℃前後、湿度は 60%前後に維持し、暗明サイクルは、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 20 匹を、日本クレア株式会社より購入し、平均体重がほぼ均等になるように 5 匹ずつ 4 群に分けて、ラット用代謝ケージ（CT-10、日本クレア

（株）製）に一匹ずつ入れて飼育した。その日から、表 1 に示した飼料を与えた。表 2 には、飼料の総エネルギー量と脂質エネルギー量が占める割合を示した。20%カゼイン食投与群をコントロール群とし、高脂肪食群には 20%カゼイン食にコーン油を 10%、20%、30%添加した飼料を与えた。飼料と水は自由摂取とし、毎日新しいものに交換した。ラットの世話は午前 8 時～午後 10 時の間に行い、体重と飼料摂取量を測定した。

実験開始日を Day 0 として、飼育最終日の Day 28 の 1 日尿（Day 28 の午前 9 時～Day 29 の午前 9 時：24 時間）を集めた。尿は塩酸酸性下で集め、一部はビタミン C 測定用に、尿と同量の 10%メタリン酸を加えて処理したものを -20℃で保存した。

採尿終了後の Day 29 の午前 9 時～10 時に断頭にて屠殺し、採血および肝臓、副腎を摘出し、重量を測定した。また、血清中のトリグリセライド、肝臓・副腎中のパントテン酸量、尿中の水溶性ビタミン量を測定した。

3. 分析方法

肝臓・副腎中のパントテン酸含量

肝臓と副腎を取り出し、乾燥を防ぐために、ラップで覆いをした状態で、37℃の恒温槽内で約 6 時間放置し、臓器中の結合型のパントテン酸を遊離型のパントテン酸にした。その後、各々の臓器重量の 10 倍量の 50 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 緩衝液（pH 7.0）でホモジネートし、そのホモジネートを 100℃の熱水浴中で 5 分間加熱処理した。そして、熱処理したホモジネートを氷中にて 5 分間冷却した。4℃、10,000 ×g で、5 分間遠心分離し、上清を得、この液を総パントテン酸測定用試料とした。定量は、*Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法にて測定した¹⁾。

血清中トリグリセライド

血清は、全血 5 ml を室温にて 30 分放置後、

室温にて、800 × g、10 分間、遠心分離した上清を測定用試料とした。血清中のトリグリセライドは、Triglyceride E テストワコー（GPO・DAOS 法）（和光純薬工業（株））にて測定した。

尿中の水溶性ビタミン

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 法に従って測定した²⁾。

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³⁾。

③ビタミン B₆ の異化代謝産物 4-ピリドキシン酸（4-PIC）

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-PIC の尿中排泄量の測定は HPLC で測定した⁴⁾。

④ニコチンアミドおよびその異化代謝産物

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⁵⁾。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⁶⁾。

⑤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¹⁾。

⑥葉酸

尿をそのまま測定用試料とした。尿中の葉酸は乳酸菌 *Lactobacillus casei* (ATCC 2773) を用いた微生物定量法を用いて測定

した⁷⁾。

⑦ビオチン

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のビオチンはビオチン要求株である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法⁸⁾に従って測定した。

⑧ビタミン C

尿に同量の 10%メタリン酸を加えて処理したものを測定用試料とした。尿中のビタミン C は HPLC 法にて測定した⁹⁾。

4. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差（SEM）で表した。有意差検定には Instat software Ver. 2.00（GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA）を用いた。検定は、One-way Analysis of Variance (ANOVA)により、有意差が認められた場合は、Turkey-Kramer Multiple Comparisons Test で個々の群の間の有意差をみた。

C. 結果

体重増加量

体重増加量を図 1 に示した。体重増加量は、対照群と三つの試験群間、すべての群間において有意な差異は認められなかった。

飼料摂取量

図 2 には、飼料摂取量を重量当たりとエネルギー当たりで示した。重量では、対照群と 30% 群で有意差がみられた。しかし、エネルギー当たりでは、すべての群間において有意差は認められなかった。

血清中のトリグリセライド含量

図 3 に、血清中のトリグリセライド量を示した。有意差は認められなかった。

肝臓と副腎重量

肝臓重量と副腎重量を表 3 に示したが、脂質摂取量による影響は認められなかった。

肝臓と副腎中の総パントテン酸含量

肝臓と副腎中の総パントテン酸含有量を図

4 に示したが、有意な差異は認められなかった。

パントテン酸の尿中排泄量

パントテン酸の尿中排泄量を図 5 に示した。パントテン酸の尿中排泄量は、対照群と比較して、10%群では差異は認められなかったが、20%群・30%群で減少した。

B 群ビタミンの尿中排泄量

図 6 に、飼料中の脂質含量がチアミン、リボフラビン、ビタミン B₆ の異化代謝産物である 4-PIC、葉酸、ビオチン、アスコルビン酸、およびニコチンアミドとその異化代謝産物の合計量である SUM の尿中排泄量におよぼす影響を示した。チアミン、リボフラビン、4-PIC、アスコルビン酸は、脂質摂取量が増大しても、差異は認められなかった。葉酸は対照群と 20%群で、ビオチンは対照群と 30%群で差異が認められた。ニコチンアミドおよびその異化代謝産物の合計量である SUM は脂質摂取量に応じて増大傾向を示した。これは、脂質の摂取量の増大により、肝 aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase 活性が低下することに起因することがすでに明らかにされている¹⁰⁾。さらに、培養細胞においても、脂肪細胞に分化する過程で *de novo* ニコチンアミド合成系が亢進することが明らかにされている¹¹⁾。つまり、*de novo* 生合成経路を有するニコチンアミドは脂質の摂取量が増大に応じて、体内で必要なニコチンアミドを供給する経路が応答することを意味している。

尿中の(2-Py+4-Py)/MNA は栄養状態の指標として利用することができるが¹²⁾、この排泄量比を図 7 に示した。この排泄量比は、脂質の摂取量に応じて低下傾向を示した。

D. 考察

脂質摂取量が増加するにしたがい、肝臓中の総パントテン酸量に影響は見られなかったが、尿中のパントテン酸排泄量が減少することを始めて明らかにした。体内でのパントテン酸必要量が高まり、尿中への排泄が減少したものと考えられる。また、他の B 群ビタミンの尿中排泄量では、大きな影響が見られたものは少なかった。葉酸、ビオチンの尿中排泄量が減少した理由は明らかではないが、体内での必要量が高まっている可能性があると考えられる。

これらのことから、今後、食事摂取基準において、脂質摂取量あたりのパントテン酸必要量をヒトを用いて検討していく必要があると思われる。

E. 健康危険情報

特記する情報は無い。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 口頭発表

①吉田永史奈, 木村尚子, 佐々木隆造, 柴田克己: ラットにおける脂質摂取量とパントテン酸尿中排泄量の関係. 日本栄養食糧学会近畿支部大会, 平成 17 年 10 月 15 日, 兵庫県立大学。

②Yoshida E, Kimura N, Sasaki R, and Shibata K., Relation between lipid intake and urinary excretion of pantothenic acid in rats. International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors. 平成 17 年 11 月 6 日～11 日, Awajisima, Hyogo, Japan.

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. Skeggs HR and Wright LD, The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26, (1944).
2. Kimura M, Fujita T and Itokawa Y, Liquid chromatographic determination of total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29-31, (1982).
3. Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K, New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628, (1983).
4. Gregory, JF and Kirk, JR, Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883, (1979).
5. Shibata K, Kawada T and Iwai K, Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28, (1988).
6. Shibata K, Ultramicro-determination of *N*¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamin*, **61**, 599-604, (1987).
7. Tamura T, Microbiological assay of folates. In *Folic Acid Metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol. 13 (Picciano MF, Stolstad ELR, and Gregory JF, III, eds) pp. 121-137, Wiley-Liss, New York, USA, 1990.
8. Fukui T, Iinura K, Oizumi J and Izumi Y, Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci. Vitaminol*, **40**, 491-498, (1994).
9. Kishida K, Nishimoto Y, and Kojo S, Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **64**, 1505-1507 (1992).
10. Shibata K. and Onodera M, Changes in the conversion rate of tryptophan-nicotinamide according to dietary fat and protein levels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1104-1108 (1992).
11. Fukuwatari T, Doi M, Sugimoto E, Kawada T. and Shibata K, Changes of the pyridine nucleotide levels in adipose differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2565-2568 (2001).
12. 柴田克己, ニコチンアミドの異化代謝産物, *N*¹-メチルニコチンアミドとそのピリドン体の排泄量比とアミノ酸栄養との関係, *ビタミン*, **64**, 1-18 (1990).

表 1. 100g 当たりの飼料組成

	対照群	試験群		
	5%コーン油群 (対照群)	10%コーン油群	20%コーン油群	30%コーン油群
カゼイン	20	20	20	20
L-メチオニン	0.2	0.2	0.2	0.2
α -コーンスターチ	46.9	46.9	46.9	46.9
ショ糖	23.4	21.8	18.4	15.1
コーン油	5	10	20	30
ミネラル混合 (AIN-93M MX)	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合 (AIN93-VX)	1	1	1	1

値は、記載のない場合は%で示した.

すべての飼料は 100g 当たり 1.6 mg のパントテン酸カルシウムを含む.

表 2. 100 g 当たりのエネルギー組成

	対照群	試験群		
	5%コーン油群 (対照群)	10%コーン油群	20%コーン油群	30%コーン油群
総エネルギー量 (kcal/100 g)	406.2	431.2	481.2	531.2
脂質エネルギー比 (%)	11	21	37	51

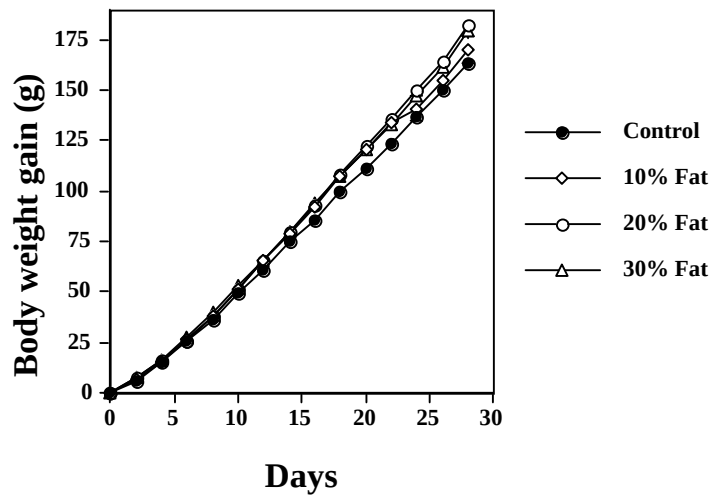


図 1. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの体重増加量におよぼす影響
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.

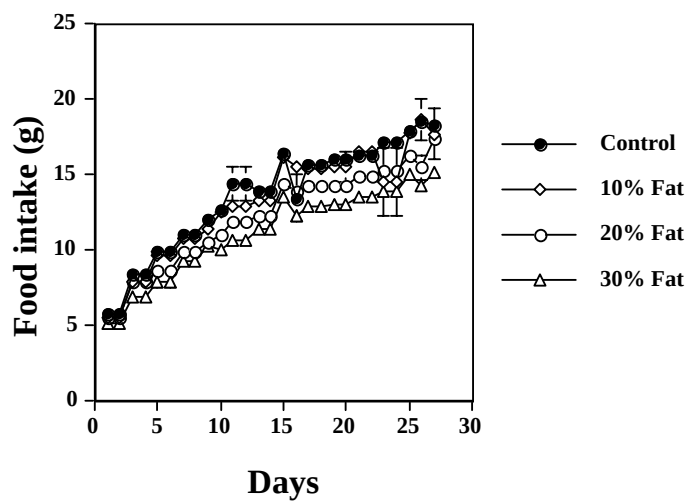


図 2. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの飼料摂取量におよぼす影響
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.

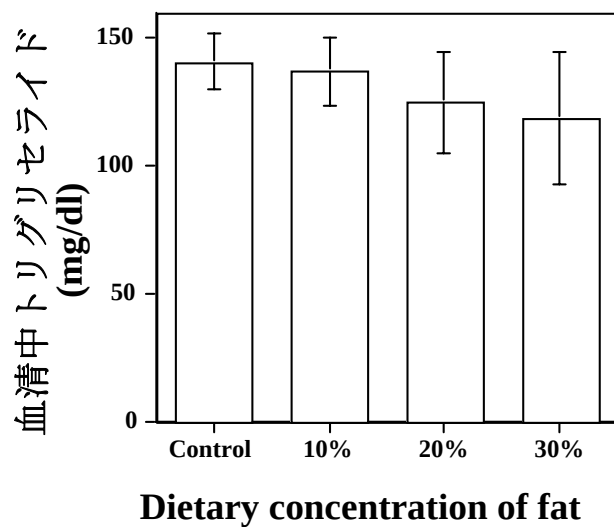


図 3. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの血清中トリグリセライド量におよぼす影響
値は平均値±SEM で示した (n=5)。

表 3. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの肝臓重量と副腎重量におよぼす影響

	Control 群		Test 群	
	5%	10%	20%	30%
肝臓 (g)	9.381±0.11	9.05±0.62	9.22±0.16	8.68±0.37
副腎 (g)	0.043±0.01	0.046±0.007	0.042±0.007	0.033±0.006

値は平均値±SEM で示した (n=5)。

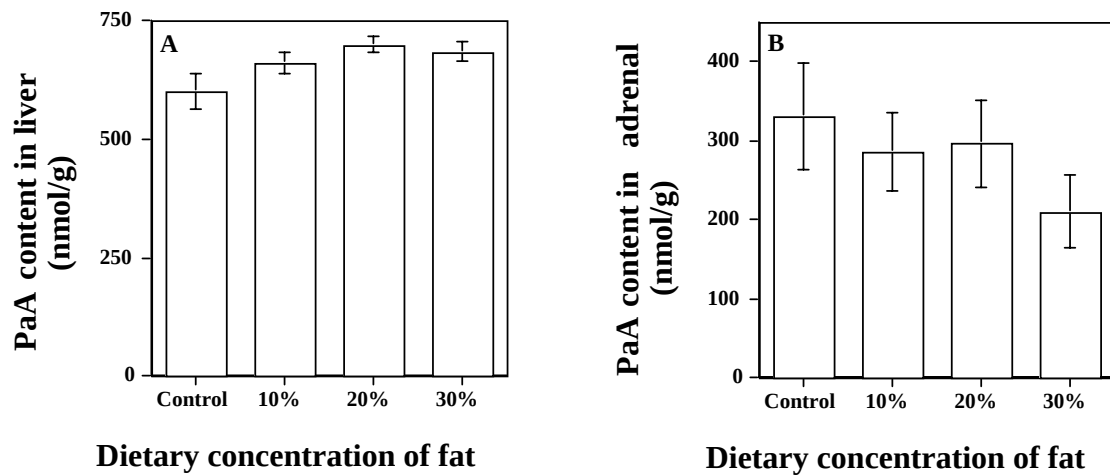


図 4. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの肝臓中総パントテン酸量 (A) と副腎中総パントテン酸量 (B) におよぼす影響
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.

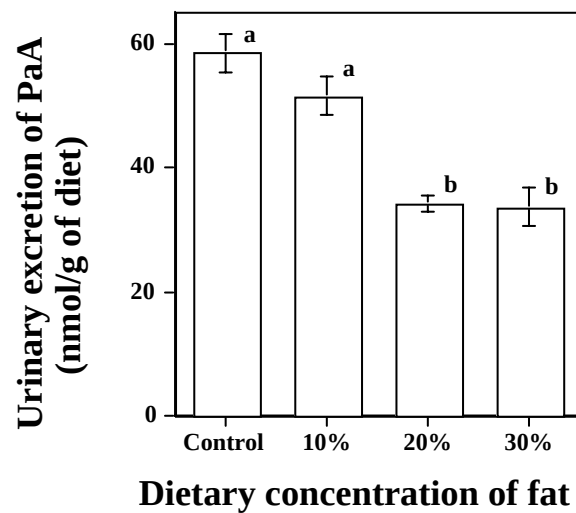


図 5. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの尿中のパントテン酸排泄量におよぼす影響
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.

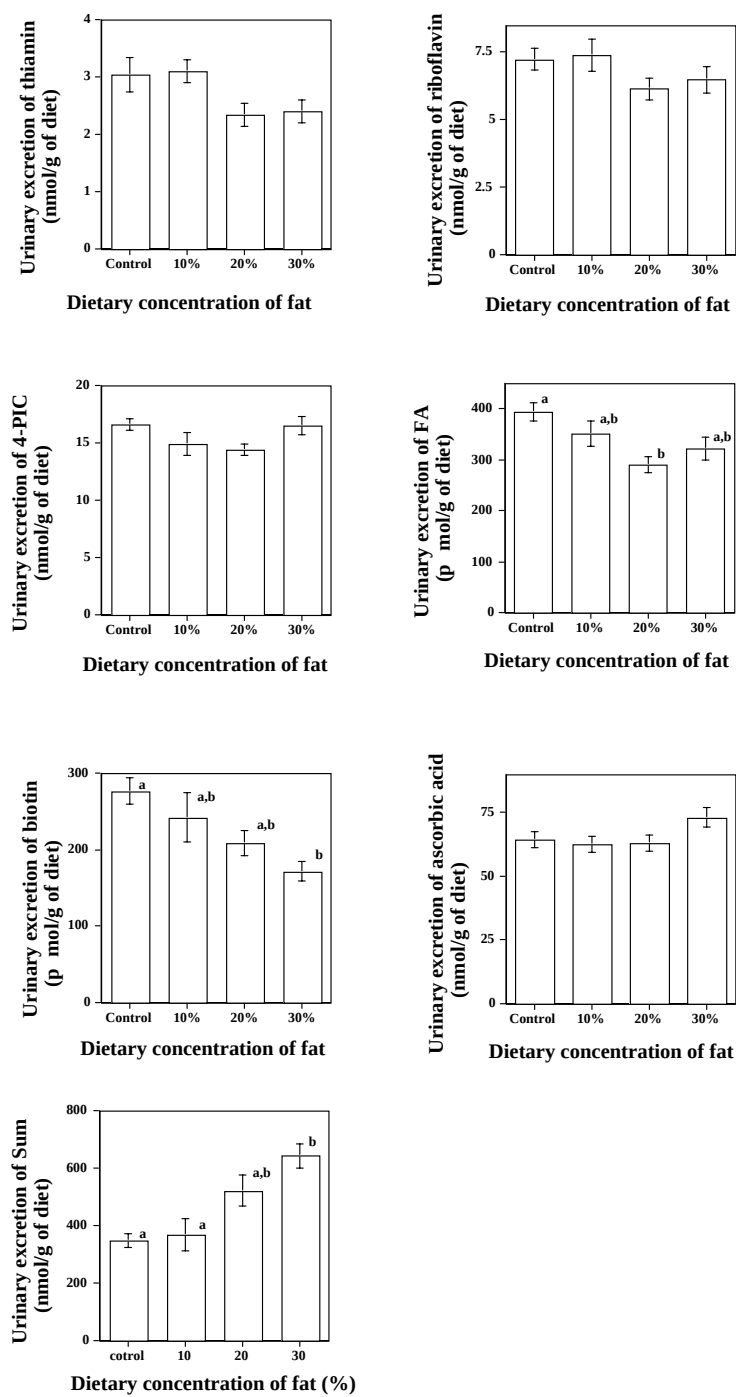


図 6. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの尿中の水溶性ビタミン排泄量におよぼす影響
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.

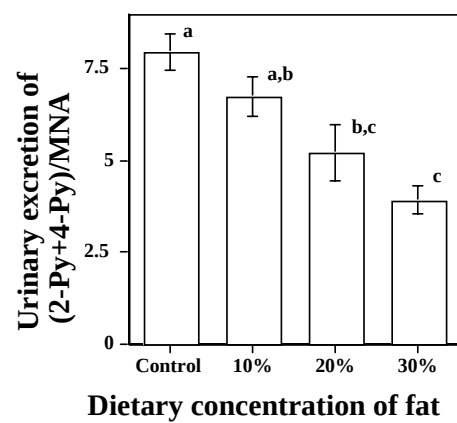


図 7. 飼料中の脂質含量が尿中の(2-Py+4-Py)/MNA 比におよぼす影響
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は $p<0.05$ で有意差が認められたことを示す.