

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

Ⅲ. 分担研究者の報告書

8. ビタミン B₂ 栄養の低下がビタミン B₆ 栄養に及ぼす影響について

分担研究者 早川享志 岐阜大学 教授
研究協力者 三嶋智之 岐阜大学 特別協力研究員

研究要旨

13 種のビタミンはそれぞれに特異的な生理作用を持っており、それぞれが独立した機能を有している。しかし、あるビタミンが別のビタミンに対して影響をする場合がある。こうしたビタミン-ビタミン相互作用の例としてビタミン B₂ (B₂) とビタミン B₆ (B₆) を取り上げ、B₂ 栄養の低下が B₆ 栄養状態にどのような影響を及ぼすのかについてラットを用いた動物実験により検討を試みた。4 週齢の Wistar/ST 系 Clean 雄ラットを AIN-76 標準飼料で予備飼育後、AIN-76 標準飼料を対照に同飼料から B₂ のみを除いた B₂ 欠乏飼料を 3 週間与えた。その結果、尿中への総 B₂ 排泄量は 1 週間目に既に低値を示し、飼育後の血漿総 B₂ 濃度および肝臓中総 B₂ 含量は約半分程度に低下していた。B₆ については、血漿のピリドキサル (PL) やピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 濃度には差が見られなかったが、B₂ 欠乏群の肝臓 PLP 含量は有意に低下し、それとは反対にピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) 含量は有意に増加した。これは、肝臓における PMP からの PLP の変換反応が損なわれていることを示すデータであると考えられた。つまり、PMP やピリドキシン 5'-リン酸 (PNP) から PLP への変換にかかわる酵素 PMP/PNP oxidase が B₂ (フラビンモノヌクレオチド: FMN) 酵素であり、この酵素が B₂ 欠乏の影響を受けて活性が低下したために肝臓における B₆ プロフィールが変化したと考えられた。本研究において、B₂ 栄養の低下が B₆ 栄養状態に影響を及ぼすことを *in vivo* において明らかにした。

A. 目的

ビタミンには 13 種類のビタミンがあるが、それぞれまったく別の化合物であり、各ビタミンは特有な働きを持っている。しかし、あるビタミンが別のビタミンに影響を及ぼす場合がある。こうしたビタミン-ビタミン相互作用についてはこれまでほとんど調べられていない。食事由来のビタミン B₆ (B₆) は通常遊離型として吸収され、体内において補酵素型に変換されて利用される。その変換過程には別の水溶性ビタミンであるビタミン B₂ (B₂) がかわる反応がある。したがって、B₂ 栄養状態が B₆ の栄養状態に影響を及ぼすことが考えられ、過去においても指摘はされているが¹⁾、*in vivo* における知見は見あたらない。そこで本研究においては、ビタミン-ビタミン相互作用の例として B₂ 栄養の低下がビタミン B₆ 栄養状態にどのような影響を及ぼすのかについてラットを用いた動物実験を行い基礎的な検討を行うことを目的とした。

B. 実験方法

1. 試薬

飼料に用いたビタミンフリーカゼイン、 α -コーンスターチ、セルロースパウダー、AIN-76 ビタミン混合、AIN-76 ミネラル混合はオリエンタル酵母工業株式会社より、メチオニンおよび重酒石酸コリンは和光純薬工業株式会社より、レチノール酢酸は Sigma Chemical Co. より、その他の用いた試薬はナカライテスク株式会社より購入した。

分析に用いた試薬については、ピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) は和光純薬工業株式会社より、アセトニトリル (HPLC グレード)、メタノール (HPLC グレード) は関東化

学株式会社より、ルミフラビンは Sigma Chemical Co. より、その他の用いた試薬はナカライテスク株式会社より購入した。

2. 実験動物の飼育法

本実験は、岐阜大学応用生物科学部動物実験委員会の承認を受けた。実験動物は 4 週齢 (体重 80~100 g) 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。飼育室の温度は 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C に設定し、明暗 12 時間サイクル (6:00~18:00) とした。ラットは 5 連の個別ゲージに入れ、実験環境に慣らすために AIN-76 標準飼料で 3 日間予備飼育した。予備飼育後、体重の平均が等しくなるように各群 7 匹からなる 2 群に分けた。Control 群には AIN-76 標準飼料を、B₂ 欠乏食群 (B₂-Def. 群) には AIN-76 標準飼料から B₂ のみを除いた B₂ 欠乏飼料を与え 21 日間飼育した。実験飼料は表 1 に示した。飼育期間中、実験飼料および飲料水 (水道水) は自由摂取とした。体重と摂食量は毎日測定し、飼料および飲料水は毎日交換した。尿中の総 B₂ および 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) 排泄量を測定するため、飼育開始 0, 1, 2, 3 週目に 24 時間尿を回収し、分析まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

ラットは本飼育開始後 22 日目にエーテル麻酔下にて開腹した後、1%ヘパリン Na 処理をしたシリンジを用いて腹部大動脈より採血し、脱血死させた。採血した血液は、15 分間遠心分離 (2,000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C) して血漿サンプルを採取し、分析まで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。さらに肝臓を摘出し、重量測定後、分析まで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

3. 尿中および血漿中の総 B₂ の分析

尿中および血漿中の総 B₂ の分析は、大川らの方法²⁾に従った。すなわち、褐色ねじ付き試験管に 0.07~1.2 μM リボフラビン標準溶液 400 μL をとり、ミリ Q 680 μL, 0.5 M 硫酸 520 μL を加えて攪拌後、80℃で 5 分間インキュベートした。氷上で冷却し、10% TCA 400 μL を加えて攪拌後、遠心管に移して高速微量冷却遠心機 MR-150 (株式会社トミー精工) で 3 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4℃) した。その上清 400 μL を試験管にとり、1 M NaOH 400 μL を加えて攪拌し、試験管の口をパラフィルムで覆った。ここまでの操作は氷上で行い、サンプルの光分解を防ぐために明かりは 60 W の豆電球 1 個のみを使用し、間接照明とした。この試験管を図 1 に示した自作の光分解装置 (光源: 20W 蛍光管 2 本) を用いて、低温室で 30 分間光照射した。光照射後、ドラフト内で氷酢酸 40 μL を加えて攪拌し、0.45 μm のメンブランフィルターに通した濾液の 100 μL を HPLC 分析に供した。

3.2. 血漿および肝臓中 B₆ ビタミンおよび尿中 4-ピリドキシン酸の分析

血漿および肝臓中の B₆ ビタミンは柘植らの方法³⁾に従い HPLC により分析した。ピリドキサル 5'-リン酸 (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-ピリドキシン酸 5'-リン酸 (4-PIC-5-P) に変換後、高感度で分析する柘植の方法⁴⁾を用いた。尿中の 4-PIC は、Gregory と Kirk の方法⁵⁾により分析した。

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差 (SE) で表し、Student の t-test により危険率 5%にて

有意性を判定した。

C. 結果

飼育期間中の体重増加曲線を図 2 に示した。実験期間中の初体重、最終体重、体重増加量、総飼料摂食量および飼料効率を表 2 に、解剖時の肝臓重量および体重 100 g 当たりの肝臓重量を表 3 に示した。最終体重、体重増加量、総飼料摂食量、飼料効率、解剖時の肝臓重量および体重 100 g 当たりの肝臓重量において B₂-Def.群は Control 群より有意に低下していた。

尿中総 B₂ 排泄量を図 3 に示した。0 週は Control 群と B₂-Def.群間に差は見られなかった。しかし B₂-Def.群において 1 週目で既に有意に低値となり、それ以降も低値のままであった。

血漿総 B₂ 濃度を図 4 に示した。B₂-Def.群は Control 群よりも有意に低値を示した。肝臓総 B₂ 含量を図 5 に示した。B₂-Def.群では Control 群よりも有意に低値を示した。

肝臓の PMP、ピリドキサル (PL)、PLP および総 B₆ (PMP+PL+PLP) 含量を図 6 に示した。PL については 2 群間に差は認められなかったが、B₂-Def.群の総 B₆ 含量は Control 群よりも有意差はないが高値を示した。B₂-Def.群の PLP 含量は有意に低値を示す一方、B₂-Def.群の PMP 含量は Control 群よりも有意に高値を示した。

血漿の PL、PLP および総 B₆ (PL+PLP) 濃度を図 7 に示した。PL 濃度および PLP 濃度について B₂-Def.群は Control 群よりも有意ではないが低値を示し、総 B₆ 濃度については B₂-Def.群が有意に低値を示した。

尿中 4-PIC 排泄量を図 8 に示した。全ての週において B₂-Def.群の 4-PIC 排泄量は

Control 群よりも低値を示す傾向であったが、有意な差はなかった。

D. 考察

PMP およびピリドキシン 5'-リン酸 (PNP) を PLP へ変換する PMP/PNP oxidase は補酵素にフラビンモノヌクレオチド (FMN) を要求することから B₂ は B₆ の代謝に深いかわりを持つと考えられる。そこで本研究においては B₂ 栄養の低下が B₆ 栄養状態にどのように影響するのかについて検討した。

ラットに B₂ 欠乏飼料を投与すると摂食量および体重増加量が減少し、肝臓中総 B₂ 含量も減少すると報告されている^{6,7)}。今回、B₂ 欠乏飼料で 3 週間飼育した場合も同様な結果であった。さらに尿中 B₂ 排泄量は B₂ 欠乏飼料の投与後、1 週間目で著しい低下が見られ、B₂ 欠乏飼料投与への応答が早期に出てくることが確認された。解剖時のラット血漿総 B₂ 濃度および肝臓総 B₂ 含量は、約半分程度に低下しており、体内 B₂ レベルの低下が確認できた。

肝臓 B₆ ビタマー含量は、PL には違いが見られなかったが、PLP は B₂-Def. 群では有意な低下が認められ、一方、PMP は PLP とは逆に B₂-Def. 群で増加していた。この結果は、肝臓総 B₂ 含量の低下に伴い FMN を補酵素とする PMP/PNP oxidase 反応が律速となり PMP の PLP への変換が低下したことによると考えられた。そこで、肝臓中総 B₂ 含量と肝臓中 PLP 含量についての相関係数は 0.661 であった。一方、肝臓中総 B₂ 含量と肝臓中 PMP 含量についての相関係数は -0.632 であった。何れも危険率 5% で有意であった。これらの結果は、先の予測を支持

する結果である。

体内の B₆ 栄養状態を反映する血漿 PLP も B₂-Def. 群で低下が見られた。これは、ひとつには肝臓での PLP 量を反映したとも考えられる。しかし、Control 群および B₂-Def. 群の血漿中の B₆ ビタマー比 (PL:PLP) が等しいことより、B₂ 栄養の低下による摂食量自体の低下を反映している可能性も否めず、血漿 PLP の低下を B₂ 欠乏だけに帰することはできない。この点は、別の条件において検討する必要がある。なお、血漿総 B₂ 濃度と血漿 PLP 濃度についての相関係数は 0.423 であった。また、血漿総 B₂ 濃度と血漿 PL+PLP 濃度についての相関係数は 0.456 であった。これも危険率 5% での有意性は認められなかった。

Fass ら (1969)⁸⁾ は摂取するリボフラビン量が低下してもフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) の体内濃度が大きく変化しないと報告している。これは FAD synthase 活性が上昇し、リボフラビンおよび FMN を低下させても FAD を保存しようとするはたらきが体内に存在するからである。B₂-Def. 群の尿中 4-PIC 排泄量が Control 群より低値であるものの近い値を示したのは、FAD を補酵素に要求する aldehyde oxidase 活性の低下によるものというよりはむしろ、摂食量低下に伴う B₆ 摂取量の低下を反映したものであると考えられる。これは血漿の PL, PLP および総 B₆ (PL+PLP) 濃度が B₂-Def. 群で Control 群よりも低いこと、B₆ の体内濃度を一定に保つために余剰の B₆ は尿中に 4-PIC として排泄されることから支持できる。今回の B₂ 栄養の低下はラットの成長に若干の低下がみられる程度であり、B₂ 不足の程度はあまり強くないと考えられ

る。しかし、B₂不足の程度が強い場合には、上記の機構により肝臓のFAD含量を維持することができなくなり、aldehyde oxidase 活性低下に伴う尿中 4-PIC 排泄量の低下が起こることは考えられるので、4-PIC の測定は必要と考えられる。

また、先の FAD 維持機構で示した FAD とは異なり FMN は B₂欠乏により低下しやすく、FMN を補酵素とする PMP/PNP oxidase は肝臓の細胞質に局在するので B₂栄養の低下の影響を受けやすいと考えられる。本実験において B₂-Def.群で見られた肝臓 B₆プロフィールは、こうした考えを支持するものであると思われる。

以上の結果より、B₂栄養状態が低下すると肝臓での B₆代謝に影響し、肝臓の B₆プロフィールが変わることを明らかにした。本実験のようなビタミン欠乏飼料投与実験においては、体重増加量や飼料摂取量などの低下が伴い、それらの要因が定量的な結果の解釈に影響を及ぼすので Pair-feeding により飼料摂取量を合わせた実験系を取り入れることによりさらに詳細な検討が可能であると考えられる。また、PMP/PNP oxidase 活性については、その測定をあわせて検討することにより B₂欠乏による影響をより直接的に示すことができると考えられる。こうした点を考慮して更なる検討が望まれる。

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

- 1) McCormick, DB (1989) Two interconnected B vitamins: riboflavin and pyridoxine. *Physiol Rev* 69(4): 1170-1198.
- 2) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1982) A simple method for micro-determination of flavins in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int* 4(2): 187-194.
- 3) Tsuge H, Oda T, Miyata H (1986) Separation and determination of vitamin B₆ derivatives by reversed-phase HPLC. *Agric Biol Chem*, 50, 195-197.
- 4) 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.
- 5) Gregory FJ, Kirk RJ (1979) Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*, 32, 879-883.
- 6) Bessey, OA, Lowry, OH, Love, RH (1949) The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues. *J Biol Chem*

180(2): 755-769.

- 7) Lakshmi AV, Bamji MS (1974) Tissue pyridoxal phosphate concentration and pyridoxamine phosphate oxidase activity in riboflavin deficiency in rats and man. *Br J Nutr* 32(2): 249-255.
- 8) Fass, S Rivlin RS (1969) Regulation of riboflavin-metabolizing enzymes in riboflavin deficiency. *Am J Physiol* 217(4): 988-991.

表1. 実験飼料組成

Ingredients	Control	B ₂ -Def.
	(%)	
Vitamin-free casein	20.0	20.0
Soybean oil	5.0	5.0
Sucrose	50.0	50.0
α -Cornstarch	15.0	15.0
Cellulose powder	5.0	5.0
AIN-76 vitamin mixture	1.0	—
Vitamin B ₂ - free vitamin mixture	—	1.0
AIN-76 mineral mixture	3.5	3.5
DL-Methionine	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2

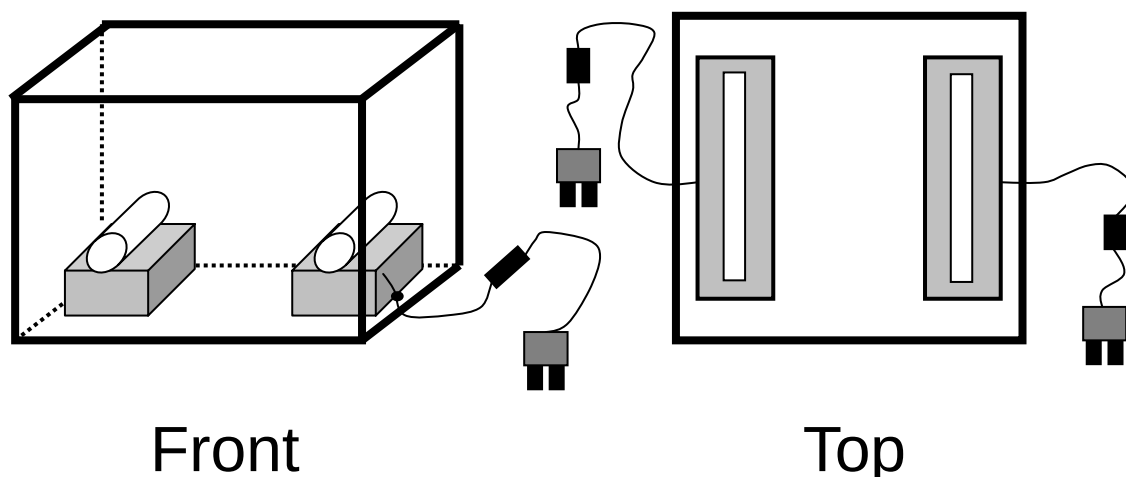


図1. 光分解装置

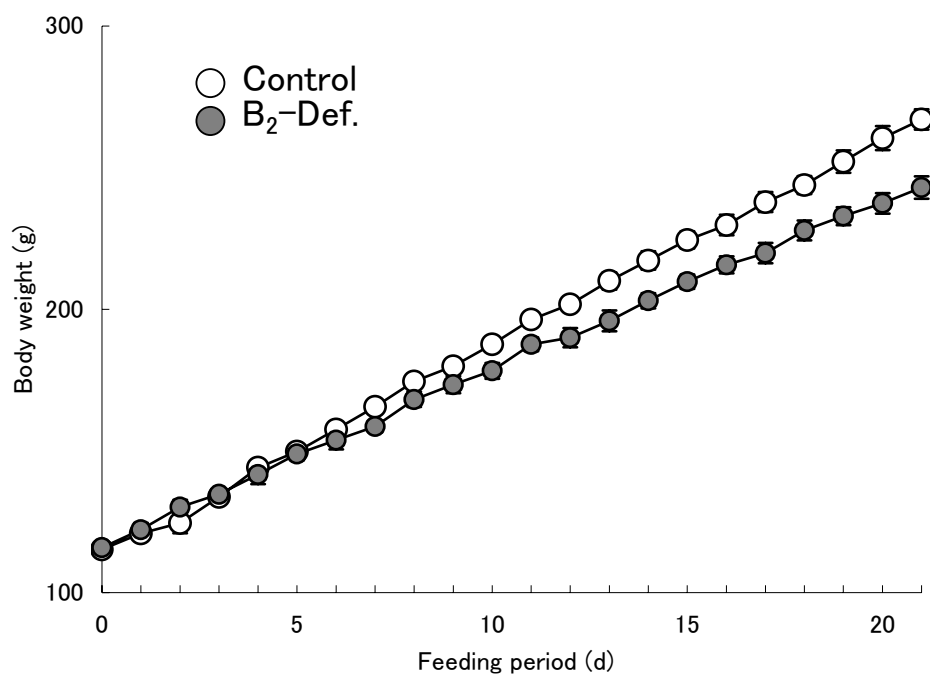


図2. ラットの成長曲線

表2. ラットの初体重, 終体重, 体重増加量, 飼料摂取量および飼料効率

	Control	B ₂ -Def.
Initial body weight (g)	115 ± 2	116 ± 2
Final body weight (g)	267 ± 4	243 ± 4*
Body weight gain (g)	152 ± 3	127 ± 3*
Total food intake (g)	349 ± 9	320 ± 7*
Feed efficiency [#]	0.436 ± 0.007	0.407 ± 0.010*

Values are means ± SE (n=7).

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

Feed efficiency = Body weight gain / Total food intake

表3. ラットの肝臓重量

	Control	B ₂ -Def.
Liver (g)	11.62 ± 0.33	8.64 ± 0.27*
Liver (g/100g body wt)	4.35 ± 0.09	3.55 ± 0.06*

Values are means ± SE (n=7).

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

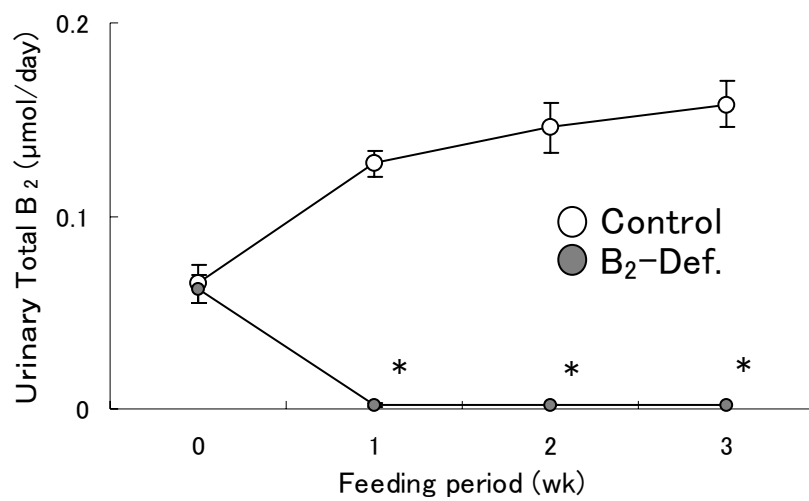


図3. 尿中総ビタミン B₂排泄量

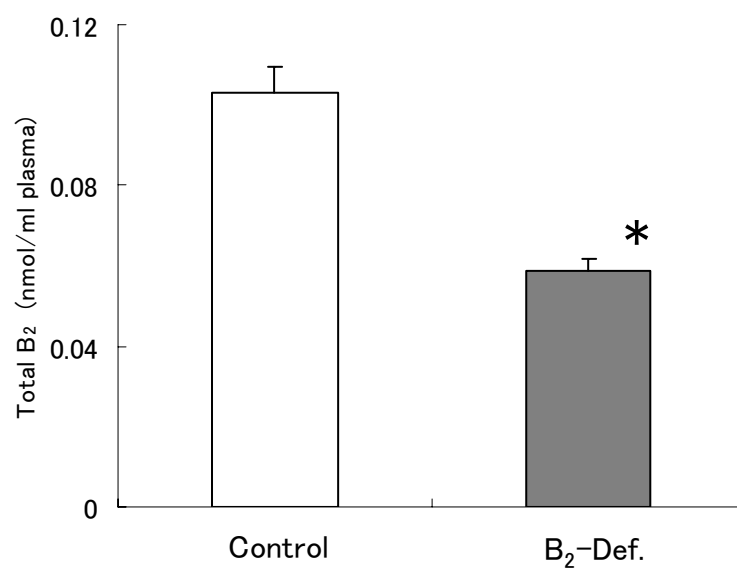


図 4. 血漿中総ビタミン B₂ 濃度

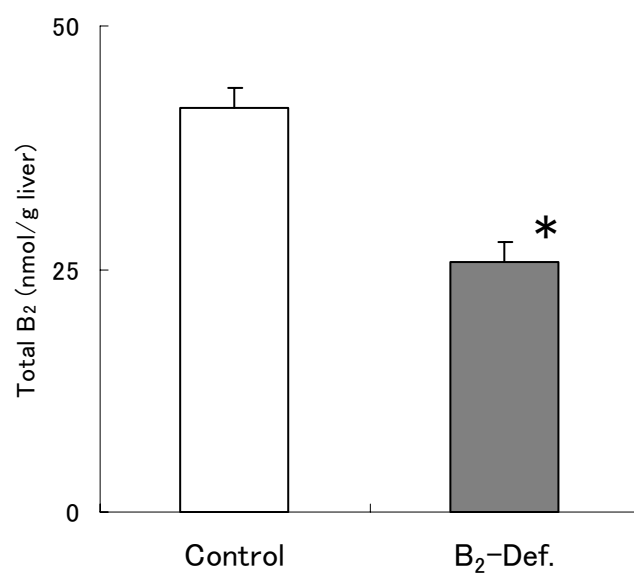


図 5. 肝臓中総ビタミン B₂ 含量

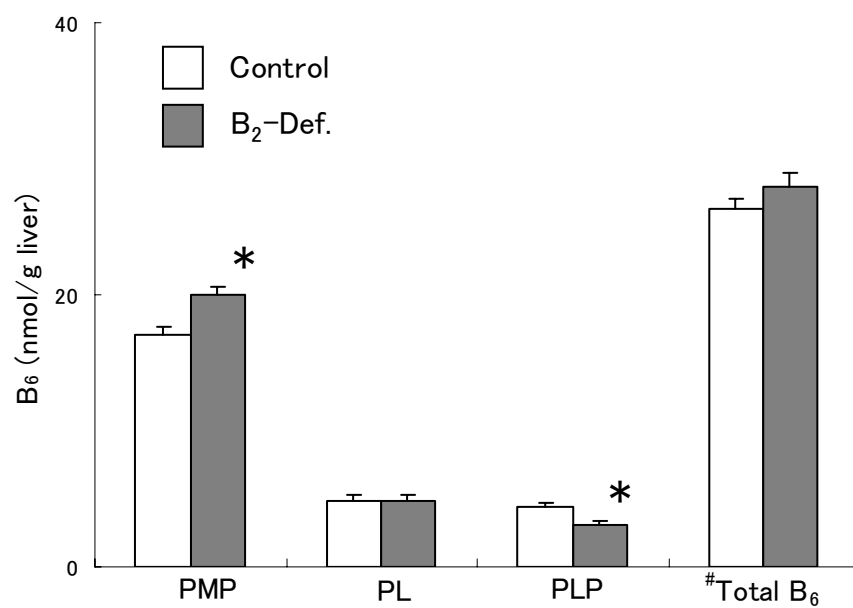


図 6. 肝臓中 B₆ ビタミン含量
(Total B₆ = PMP + PL + PLP)

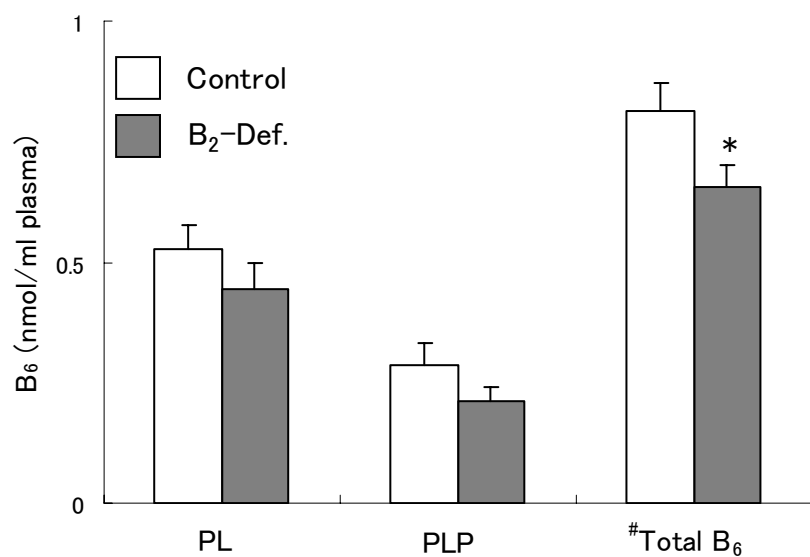


図 7. 血漿中 B₆ ビタミン濃度
(Total B₆ = PL + PLP)

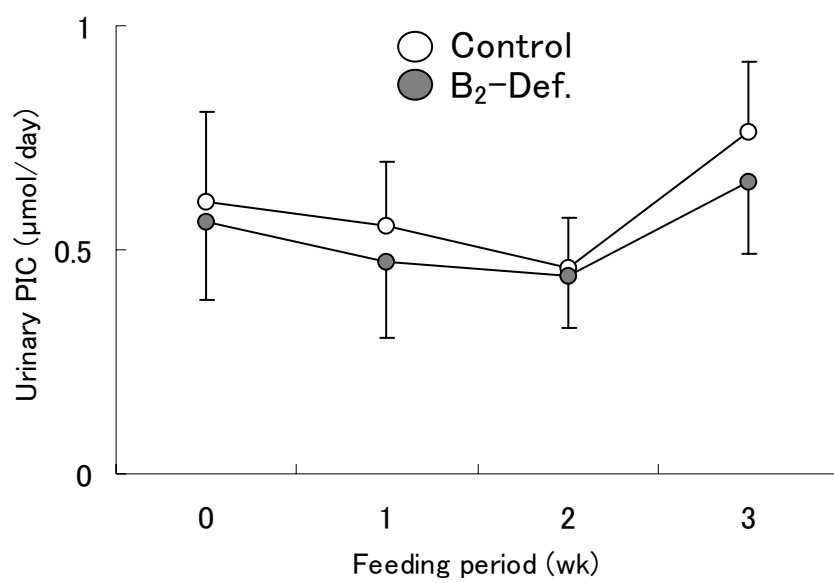


图 8. 尿中 4-PIC 排泄量