

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

9. 標準飼料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
研究協力者 三嶋智之 岐阜大学 特別協力研究員

研究要旨

ビタミン B₆ (B₆) の食事摂取基準は、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られているが、両者の値には大きな隔たりがある。B₆ の食事摂取基準は、たんぱく質あたりの B₆ 必要量をもとに算定されているが、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。成長期においては、成熟期に比べてたんぱく質の同化による利用が大きく、異化は成熟期に比べて少ない。従って、若齢期における B₆ の必要量は、たんぱく質摂取量あたりで求めた値では、余剰である可能性がある。そこで、本研究においては、4 週齢の若齢ラットと 20 週齢の成熟ラットをそれぞれ成長期と成熟期と考え、それらラットに標準飼料（たんぱく質含量 20%）を摂取させた場合の B₆ 栄養状態について評価することにより、成長期と成熟期のたんぱく質代謝状況の違いが B₆ 栄養状態に影響を及ぼすか否かについて検討することを目的とした。その結果、標準飼料（たんぱく質摂取量あたりの B₆ 摂取量は同じとなる）を摂取したラットの場合、B₆ 栄養状態の指標である血漿ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) レベルや肝臓中 B₆ レベルは、若齢と成熟ラット間では差はなかったが、クレアチニン当たりの 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) 排泄量は、若齢ラットの方が有意に高くなっていた。しかし、クレアチニン排泄量は成熟ラットでは高まっていたので、クレアチニンあたりでの算出結果を指標として用いることは適切ではないと判断された。そこで、100g 体重・1 日あたりの尿中 B₆ 排泄量あるいは 4-PIC 排泄量として求めたところ若齢ラットでは排泄量が高い様相がみられた。一方 B₆ 摂取量 1 mg あたりの尿中 B₆ 排泄量は、成熟ラットで高く、逆に尿中 4-PIC 排泄量は若齢ラットで高かった。尿中 4-PIC と B₆ を合計した尿中の B₆ 化合物排泄量は、有意ではないが若齢ラットで高い傾向にあった。一般に 4-PIC は余剰な B₆ が代謝されて排泄される排泄型の B₆ 化合物であるので、若齢ラットにおいては、B₆ が余剰な状況を示唆する結果ではないかと考えられた。

A. 目的

ビタミン B₆ (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 B₆ の食事摂取基準はまだ未確定な部分が残されている。現在 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、たんぱく質の生体における利用状況も影響すると考えられる。例えば、成長期においては、同化による利用が多く、異化代謝の割合は少なく、成熟期においては逆となっている。つまり、成熟期においては、異化代謝が盛んであり、その分 B₆ の必要量も高いのではないかと考えられる。一般に B₆ の必要量は、たんぱく質摂取量が増すと増加する¹⁾という報告がたんぱく質摂取量あたりで B₆ の食事摂取基準を策定する根拠となっているが、基になっている条件は成人について得られたデータである。従って成長期と成熟期でのたんぱく質代謝状況の違いが B₆ の必要量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 B₆ 必要量に違いがある可能性があるのではないかとということである。

B₆ の栄養評価は、中長期的には血漿中ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) レベルにより判定される²⁾。一方、余剰な B₆ は尿中に排泄され、一部は 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) として排泄される³⁾。従って、体内 B₆ 栄養指標として血漿中 PLP レベルを、B₆ の代謝指標として尿中 B₆ 関連物質排泄量を測定することにより 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標準飼料 (飼料中たんぱく質含量 20%) を摂取させた場合の B₆ 代謝状況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 B₆ 必要量に影響を及ぼすか否かについて検討することを目的として、若齢ラットと成熟ラットにおける栄養状態について検討を行った。

B. 実験方法

1. 動物実験法

実験動物は 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。ラットは購入後予備飼育に用いる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。飼育室の温度は 23±1℃ に設定し、

明暗 12 時間サイクル (6:00~18:00) とした。

予備飼育には AIN-76 標準飼料を用い、本飼育においてはビタミンフリーカゼインを用いた同組成の飼料を与えた。飼料組成は表 1 に示した。飼料成分であるビタミンフリーカゼイン、AIN-76 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、酢酸レチノールは Sigma Chemical Co. 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-76 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、20 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、28 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。飼育開始 4 週目に 24 時間尿を採取し、分析まで -20℃ で保存した。尿については尿量、クレアチニン量および 4-PIC 量および総 B₆ 量の測定に供した。

本飼育開始から 29 日目にエーテル麻酔下で解剖を行った。開腹後、採血は 1%ヘパリン Na 処理したシリンジと注射針を用いて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℃) 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℃ 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 4-PIC の分析

血漿 PLP および肝臓中の PLP とピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) 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-ピリドキシン酸 5'-リン酸 (4-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-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 B₆ 量の測定

4 週目に回収した尿は、1500×g, 4℃で 10 分間遠心分離しその上清を -20℃ で保存した。この尿サンプルは 0.055 M HCl 下 121℃ 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⁾。

4. その他の分析法

尿中クレアチニンは、Wchstein と 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、成熟群の体重増加量は小さかった。

血漿 PLP 濃度を図 1 に、肝臓 PLP および PMP 含量を図 2 示した。何れも、殆ど差はみられなかった。クレアチニンあたりの尿中 B₆ 排泄量および尿中 4-PIC 排泄量を図 3 および図 4 に示した。B₆ 排泄量は若齢群の値が高かったが、有意な差は見られなかった。一方、4-PIC 排泄量は、若齢群では有意に高値を示した。体重 100g、1 日当たりの尿総 B₆ 排泄量および尿中 4-PIC 排泄量を図 5 および図 6 に示した。両者とも若齢群で高かったが、有意差はみられなかった。次に B₆ 摂取量 1mg あたりの尿総 B₆ 排泄量および尿中 4-PIC 排泄量を図 7 および図 8 に示した。尿 B₆ 排泄量は成熟群で高い値を示したが、有意な差はなかった。B₆ 摂取量 1mg あたりの尿中 4-PIC 排泄量は若齢群で有意に高かった。B₆ 摂取量 1mg あたりの尿総 B₆ および尿中 4-PIC 排泄量の合計については、若齢群で高かったが、有意な差はなかった。

D. 考察

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 20% の通常のレベルでたんぱく質に対する B₆ の摂取比率は若齢群と成熟群では同じである。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⁾ことが示されているが、今回は同じたんぱく質レベルであるので、若齢群と成熟群の B₆ 栄養状態の違いは、両群における B₆ 必要量に応答すると考えられる。今回の実験においては、血漿中 PLP 濃度も、肝臓中 PLP および PMP 含

量に違いは見られなかったが、尿中への排泄状況には若干の違いが認められた。クレアチニンあたりでの 4-PIC 排泄量は、若齢群で有意に高かった。しかし、クレアチニン排泄量自体が成熟ラットでは高くなっていることから、クレアチニンあたりの指標は適切ではないと判断した。そこで、100g 体重、1 日あたりの排泄量としての B₆ および 4-PIC を評価した場合、若齢群で値は高かったが、有意な差ではなかった。一方、B₆ 摂取量 1mg あたりでは、B₆ 排泄量は、成熟群で高かったが有意差は見られなかった。しかし、この場合の 4-PIC 排泄量は、若齢群で有意に高値を示した。両者を合わせると、若齢群の排泄量が高い様相であったが、有意な差ではなかった。一般に 4-PIC は短期的な B₆ 摂取量を反映するといわれており、長期的な B₆ 栄養状態を反映する PLP とは指標としての意味は異なるが、今回の結果からは、若齢群において B₆ の排泄が高くなっていると考えられた。

今回の実験においては、ラットの体重に違いがあるため、尿への B₆ および 4-PIC 排泄量は、クレアチニンあたりで表すことには問題があると判断した。その代わり、100g 体重・1 日あたり、あるいは、mg PN eq. で考えた。これによると若齢群では、尿への B₆ 排泄量は、クレアチニンの影響は受けずに評価が可能であると思われた。

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 Dietary protein as a factor affecting vitamin B₆ requirement. *J Nutr Sci Vitaminol*, 44,37-45. (1997)

- 2) Lumeng L, Ryan PM, Li T Validation of the diagnostic value of plasma pyridoxal 5'-phosphate measurements in vitamin B₆ nutrition of the rat. *J Nutr*, 108, 545-553. (1978)
- 3) Gregory FJ, Kirk RJ Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*, 32, 879-883. (1979)
- 4) Tsuge H, Oda T, Miyata H Separation and determination of vitamin B₆ derivatives by reversed-phase HPLC. *Agric Biol Chem*, 50, 195-197. (1986)
- 5) Tsuge H, Toukairin-Oda T, Shoji T, Sakamoto E, Mori M, Suda H Fluorescence enhancement of PLP for application to HPLC. *Agric Boil Chem*, 52, 1083-1086. (1988)
- 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 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. (1953)
- 8) Institute of Medicine Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. (1998) Washington, DC: National Academy Press.
- 9) Hansen CM, Leklem JE, Miller LT 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. (1996)

表 1. AIN-76標準飼料組成

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

表 2. 終体重, 体重増加量, 総飼料摂取量および飼料効率

	Young	Adult
Final body weight (g)	289 $\pm$ 7	491 $\pm$ 6*
Body weight gain (g)	180 $\pm$ 6	49 $\pm$ 5*
Total food intake (g)	458 $\pm$ 14	506 $\pm$ 9*
Feed efficiency	0.394 $\pm$ 0.005	0.097 $\pm$ 0.010*

Values are means $\pm$ SE (n=8).

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

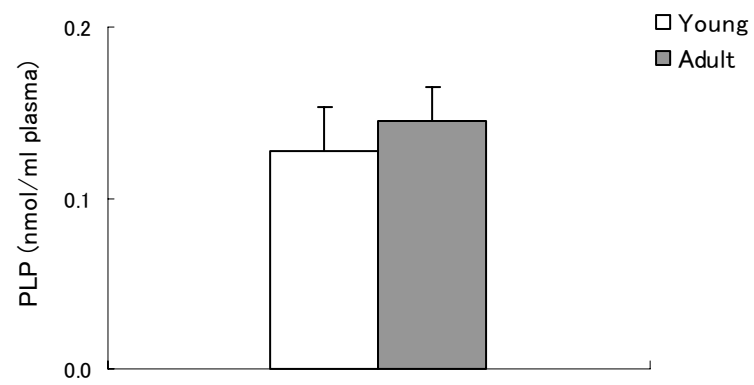


図 1. 血漿 PLP 濃度

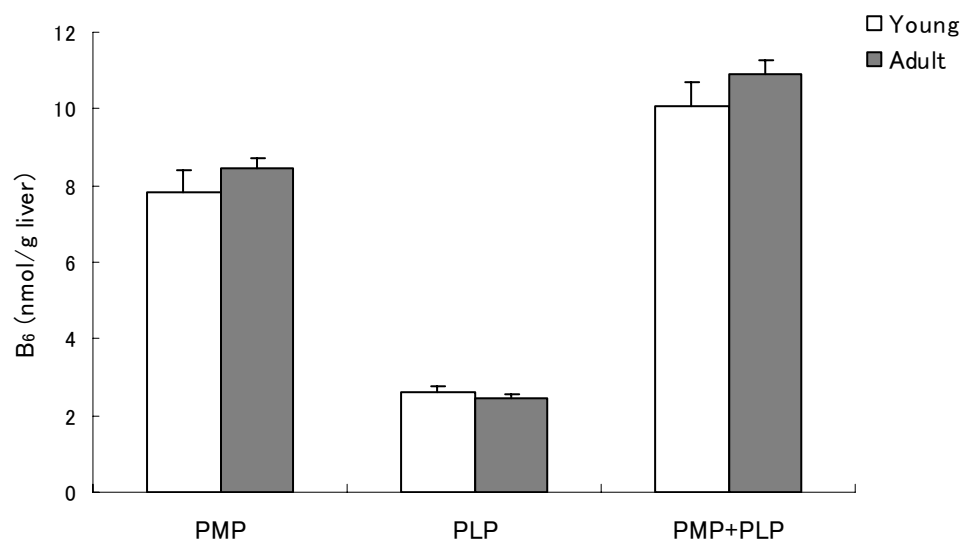


図 2. 肝臓 PMP および PLP 含量

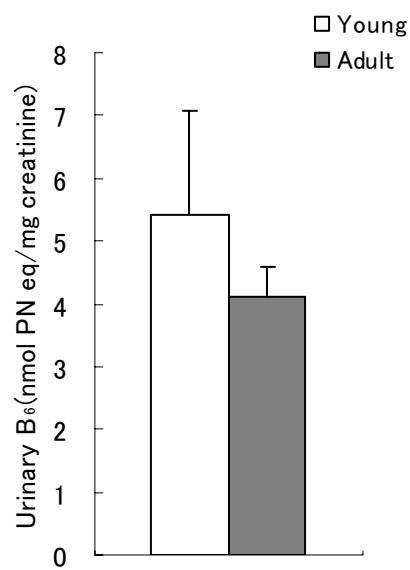


図3. クレアチニン 1mg あたりの尿中 B₆ 排泄量

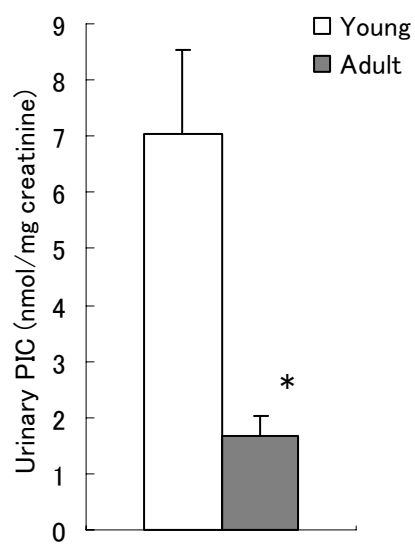


図4. クレアチニン 1mg あたりの尿中 4-ピリドキシン酸 (PIC) 排泄量

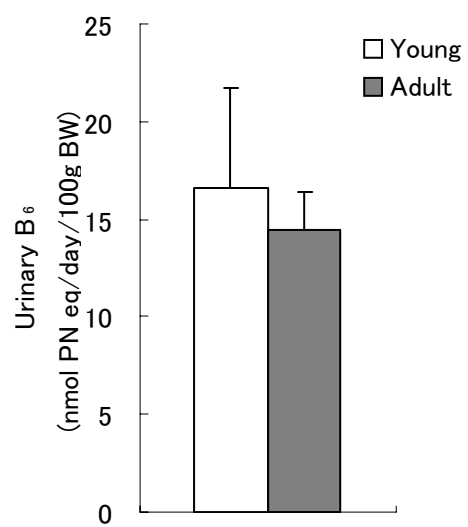


図5. 体重 100 g, 1 日あたりの尿中 B₆ 酸排泄量

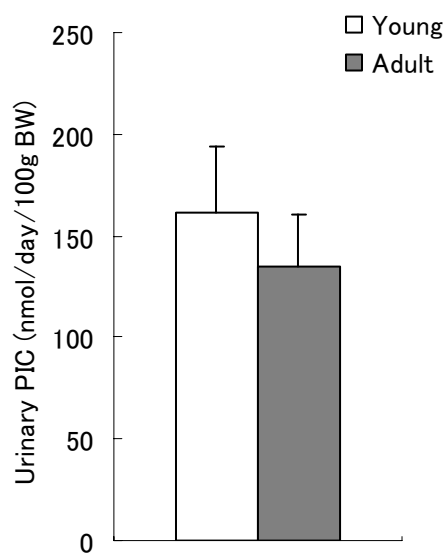


図6. 100 g 体重, 1 日あたりの尿中 4-ピリドキシン酸排泄量

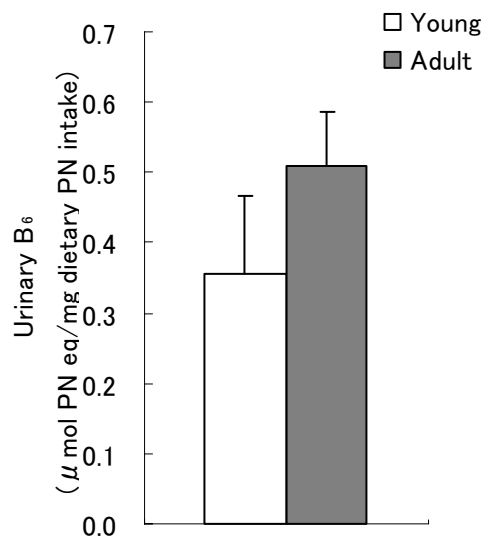


図 7. B₆摂取量 1mg あたりの尿中 B₆排泄量

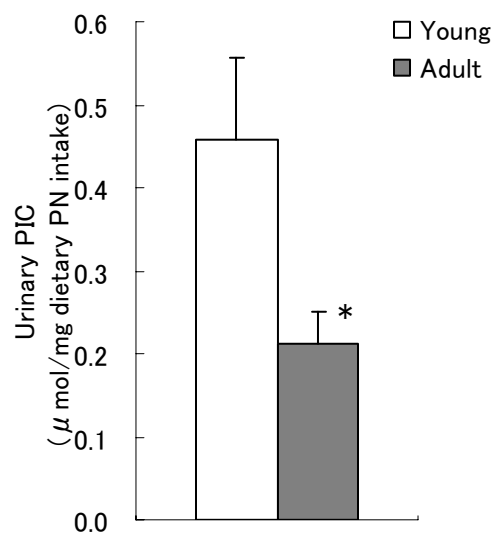


図 8. B₆摂取量 1mg あたりの尿中 4-ピリドキシン酸排泄量

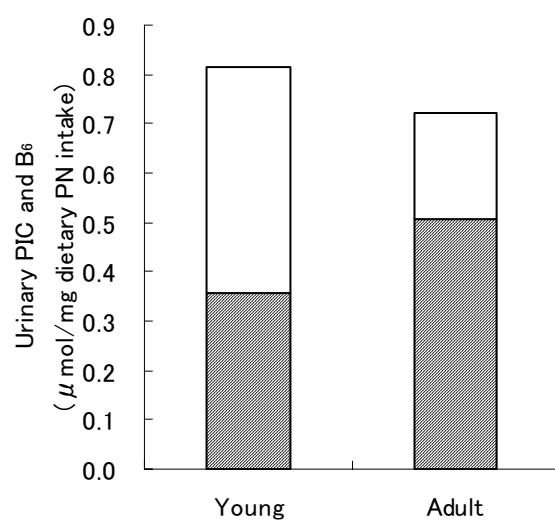


図 9. B₆摂取量 1mg あたりの尿中 4-ピリドキシン酸と B₆排泄量
(Hatched bar: Urinary B₆, Open bar: Urinary PIC)