

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明－

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

### 10. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける ビタミン体内動態の解析

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

糖尿病患者では、血中抗酸化ビタミン濃度（ビタミン C , E）が低下することが知られている。しかし、血中濃度が低値を示す原因は明らかにはされていない。そこで、本研究ではストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病ラットを用い、8 種類の B 群ビタミンとビタミン E の体内動態について検討した。Wistar 系雄ラットにストレプトゾトシン（70 mg/kg/BW）を腹腔内投与し、2 週間後の血液および尿中ビタミン量の測定を行った。血中ビタミン濃度と 24 時間尿中ビタミン量より算出したビタミンクリアランス（ナイアシン除く）は、STZ ラットにおいて高値を示した。これより、STZ ラットでは、正常ラットに比して血中のビタミンが尿中により多く排泄されることが示され、糖尿病進展予防におけるビタミン付加の必要性が示唆された。

## A. 目的

糖尿病患者では、血中ビタミンC、E濃度が低値を示すことが知られている<sup>1,2)</sup>。また近年、糖尿病患者では腎臓でのチアミンクリアランス増加のために血中チアミン濃度が低下しており、チアミンの補給が有用であると示唆する報告がなされた<sup>3)</sup>。これは糖尿病患者におけるチアミンの潜在的な欠乏を示した最初の研究であるが、チアミンを除くその他のビタミンについては血中ビタミン濃度が低下するメカニズムについては明らかでない。チアミンと同様、血中ビタミン濃度が低値であるのは、尿中にビタミンが多く排泄されるためかもしれない。既に報告されているチアミン以外のビタミンにおいても尿中クリアランスが増大し、潜在的なビタミン欠乏が起こっている可能性がある。

本研究ではラットにストレプトゾトシンを投与し糖尿病を発症させ、血中および尿中ビタミン量より、ビタミンクリアランスを算出することを目的とした。

## B. 実験方法

### 1. 動物飼育

本研究は、滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。本実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」及び滋賀県立大学実験動物委員会で承認を受けたものである。6週齢のWistar系雄ラットを日本クレア(株)より購入した。ラットは個別ケージで飼育し、飼料は20%カゼイン食(20%ビタミンフリーカゼイン、0.2%L-メチオニン、22.9%スクロース、45.9% $\alpha$ -コーンスターチ、5%コーンオイル、5%ビタミン混合、5%ミネラル混合(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取とし、水も自由摂取とした。

室温(22 $\pm$ 2°C)、湿度(55 $\pm$ 5%)、12時間の明暗サイクルが維持された飼育室にて飼育した。実験最終日(Day 27)の24時間尿(9時~9時)を集めた。尿は1Mの塩酸を1mL入れたコニカルビーカーに集めた。解剖時にEDTA入りの採血管に血液を採取し、全血、血漿を処理し、使用するまで-20°Cで保存した。

### 2. 糖尿病ラットの作製

1週間の予備飼育後、ラットにストレプトゾトシン(STZ)(70 mg/kg/体重)(和光純薬株式会社)を腹腔内投与し、ストレプトゾトシン糖尿病ラットを作製した<sup>5)</sup>。そしてSTZラット作製1週間後に飽食状態での血糖値が300 mg/dL以上を示したラットをさらに2週間飼育し、糖尿病態ラットとして実験に使用した。なお、STZは0.1 Mクエン酸にてpH 4.4に調整した生理食塩水に溶解し、使用した。対照群には生理食塩水(pH 4.4)を投与した。

### 3. ビタミンの測定方法

血中総チアミン濃度は、チアミン、TMP、TDPの合計とした。全血にトリクロロ酢酸を加えて除タンパクを行い、HPLCによる分析に供した<sup>6)</sup>。尿は、直接HPLCに注入して、分析に供した<sup>6)</sup>。

血中リボフラビン濃度は、リボフラビンFMN、FADをルミフラビンに光分解し、ルミフラビンを測定することにより総リボフラビン量とした。採血後、全血に水と硫酸を加えて熱処理を行った後、トリクロロ酢酸を加え、除タンパクした。遠心分離後の上清を得、この上清をアルカリ条件下で光照射し、これをHPLCによる分析に供した<sup>7)</sup>。尿は直接HPLCに注入し分析に供した<sup>7)</sup>。

血中ピリドキサーリン酸(PLP)濃度を測定するために、血漿にメタリン酸を加え除

タンパク質, HPLC による分析に供した<sup>19)</sup>. 尿中 4-PIC 量を測定するために, 尿 9 mL に 1 M HCl を 1 mL 加えて安定化した. この尿を HPLC による分析に供した<sup>9)</sup>.

血漿ビタミン B<sub>12</sub> 濃度を求めるために, シアン化カリウム存在下で血漿中のビタミン B<sub>12</sub> をシアノコバラミンに変換し, *Lactobacillus leichmanii*, ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法に供した<sup>10)</sup>. 尿中ビタミン B<sub>12</sub> 量を求めるために, 尿 900 μL に 180 μL の 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8), 水 680 μL, 0.025%シアン化カリウム溶液 20 μL を加え, 120°C で 5 分間オートクレーブ処理した. 氷冷後, 20 μL の 10%メタリン酸溶液を加え, 遠心分離によって上清を得た. *Lactobacillus leichmanii*, ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法にこの上清を供した<sup>10)</sup>.

血中ニコチンアミド濃度を求めるために, 全血にイソニコチンアミド溶液を加えてオートクレーブし, 遠心分離後の上清を得, この上清をアルカリ中でエーテル抽出し, HPLC による分析に供した<sup>11)</sup>. 尿中総ニコチンアミド代謝産物量はニコチンアミド, N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (MNA), N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計とした. 尿中総ニコチンアミド代謝産物量を測定するために, 尿 9 mL に 1 M HCl を 1 mL 加えて安定化した. この尿を HPLC 法に供し, 尿中ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py 各含量を測定とした<sup>11)</sup>. また, 尿中 MNA 含量を HPLC 法で測定した<sup>12)</sup>.

血漿中パントテン酸濃度を測定するために, *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に血漿を供した<sup>13)</sup>. 尿中パントテン酸量を測定するために,

*Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に尿を供した<sup>13)</sup>.

血漿中ビオチン濃度を測定するために, *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に血漿を供した<sup>14)</sup>. 尿中ビオチン量を測定するために, 尿を微生物学的定量法に供した<sup>14)</sup>.

血漿中葉酸濃度を測定するために, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物学的定量法に血漿を供した<sup>15)</sup>. 尿中葉酸量を測定するために, 尿 9 mL に 1 M アスコルビン酸溶液を 1 mL 加えて安定化した. *Lactobacillus rhamnosus*, ATCC 27773 を用いた微生物学的定量法にこの尿を供した<sup>15)</sup>.

ビタミン E は α-トコフェロールとして表した. 尿中 α-トコフェロール代謝物である 2,5,7,8-テトラメチル-2(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン (α-CEHC) の測定は, 尿 1 mL に β-glucuronidase を加え, 抱合体を加水分解させた後, エーテル抽出し HPLC による分析に供した<sup>16)</sup>. 血漿トコフェロール量の測定は, 玉井ら<sup>16)</sup>の方法に従いケン化法にて抽出を行い, 蛍光検出器を装着した HPLC にて測定を行った.

#### 4. ビタミンクリアランスの算出

ビタミンクリアランス (mL/min) は, 24 時間尿中ビタミン排泄量 / { 血中ビタミン濃度 × 1440 (min) } から算出した.

#### 5. 過酸化脂質の測定

血漿過酸化脂質は八木ら<sup>17)</sup>の蛍光法 (TBA 法) に従って測定し, 脂質の過酸化に伴って生成するマロンジアルデヒドを測定し, チオバルビツール酸反応物 (TBARS) として表した.

6. 血中グルコース, 尿中グルコース, 血中トリグリセライド, 総コレステロールの測定

血漿中グルコース及びトリグリセライド、総コレステロール、尿中グルコース濃度は富士ドライケム ((株)富士フィルム) を用いて測定した。それぞれ、グルコースはグルコースオキシダーゼ、トリグリセライドはリポプロテインリパーゼ、総コレステロールはコレステロールオキシダーゼを用いた酵素法にて測定した。

## 7. 統計処理

データは平均値 ± 標準偏差で表した。2群間の有意差検定は unpaired Student t-test によって行い、*p* 値が 0.05 以下のとき統計的有意差があるものとした。計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 4 を使用した。

## C. 結果

### 1. 体重、飼料摂取量、臨床検査値、過酸化脂質値

Day 28 での STZ ラットの体重は、生理食塩水のみを投与した対照ラットと比較して減少した (図 1) が、飼料摂取量は増加した (図 1)。したがって、飼料効率は、STZ ラットが対照ラットに比べ約 3.6 倍低い値を示した。血中、尿中グルコース、血漿中トリグリセライド、血漿中総コレステロール濃度は、STZ ラットにおいてそれぞれ約 9.1 倍、66.5 倍、7.9 倍高く、高血糖に併せて脂質代謝異常であることも確認された。また、血中過酸化脂質値は STZ ラットにおいて有意に高値を示し、生体内で酸化ストレスが亢進していることが示唆された。

### 2. ビタミンクリアランス

血中ビタミン濃度と 24 時間尿中ビタミン排泄量よりビタミンクリアランスを算出し

た (図 2)。ビタミンクリアランス (mL/min) は、24 時間尿中のビタミン排泄量 / (血中ビタミン濃度 × 1440) より算出した。これは尿中に排泄されるビタミンは、血液中のビタミンにして何 mL 分に相当するのかわを示す指標として使用した。ナイアシンを除く 8 種類のビタミンにおいて、STZ ラットが高値を示した (図 2)。STZ ラットの方が、約 3 倍から 21 倍ビタミンクリアランスが高いことが示された。つまり、STZ ラットでは、より多くの血中ビタミンが尿中に排泄されていることが明らかとなった。ナイアシンに関しては、両群間で差は認められなかった。

## D. 考察

糖尿病における持続的高血糖状態では、酸化ストレスが亢進し、血中ビタミン濃度が低値を示すことが報告されている<sup>1,2)</sup>。しかしながら、高血糖状態において血中ビタミン濃度が低下するメカニズムは明らかにはされていない。そこで、本研究ではストレプトゾトシンを投与した糖尿病ラットを作製し、血中及び尿中ビタミンを測定し、病態におけるビタミン体内動態について検討した。血中ビタミン濃度は、B<sub>6</sub>に関しては、STZ ラットにおいて低値を示したが、その他のビタミンについては、2 群間で差は見られなかった (データには示していない)。STZ ラットにおいて血中ビタミン濃度が低値を示さなかった要因として、STZ ラットの飼料摂取量が対照群の 1.5 倍多いことに起因するものだと考えられた。

次に尿中ビタミン排泄量について検討した。健康人においては、尿中に排泄されるビ

タミン量が栄養指標として利用可能なことのデータが蓄積しはじめている。必要量を満たすことができないと、生体側は尿中に排泄されるべきビタミンを利用するために尿中ビタミン濃度は低下し始め、逆にサプリメントなどで過剰に摂取された場合には、速やかに尿中に排泄される。しかし、今回 STZ により糖尿病を誘発したラットの血中ビタミン濃度は、高値ではなかったにもかかわらず、尿には多くのビタミンが排泄されていた。この原因を明らかにするために、血中ビタミン濃度と尿中ビタミン排泄量よりビタミンクリアランスを算出し、検討した。ビタミンクリアランスは、ナイアシンを除き STZ ラットにおいて高値であった。これより STZ ラットでは、多くの血中ビタミンが尿中に排泄されていることが示された。糖尿病が進行すると腎肥大と糸球体過剰濾過が起こる。実際、STZ ラットの腎臓重量は、対照ラットの  $6.8 \pm 3.0$  (g/kg BW) に対し、STZ ラットでは  $18.4 \pm 5.8$  (g/kg BW) と約 3 倍増であり、腎機能が低下していることが考えられた。STZ ラットにおけるビタミンクリアランスの増加は、高血糖状態により腎機能が低下し、本来腎臓で再吸収されるであろうビタミンが尿中に過剰に排泄されたためであると示唆された。また、STZ ラットではビタミン体内プールが減少、つまりビタミンの生体内保持能が低下するために、尿中に多く排泄されたのではないかと考えられる。

以上より、STZ を投与した高血糖ラットでは、健常な状態とは異なり、血中ビタミン濃度が高値ではないにもかかわらず、尿中に多く排泄されることが確認された。これは、ク

リアランスを求めることによって血中ビタミンが尿中に多く排泄されることによるものと明らかにされた。この STZ 誘発糖尿病ラットにおけるビタミンクリアランスの増加は、ナイアシンを除く 8 種類のビタミン全てにおいて確認された。高血糖状態である糖尿病患者においても同様にクリアランスが高値であることが考えられ、糖尿病進展におけるビタミン付加の必要性が示唆された。

#### 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

今井絵理, 福渡努, 柴田克己 第 47 回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会 (奈良女子大学) 2008 年 10 月 25 日 (土) ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおけるビタミン体内動態の解析

#### 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. Dinçer Y, Alademir Z, Ilkova H, Akçay T. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control. *Clin Biochem.* (2002) 35(4),297-3012.
2. Vadde R, Rama J. Evaluation of oxidative stress in insulin dependent diabetes mellitus patients. *Diagnostic pathology* (2007) 2 , 22
3. Thornalley PJ, Babaei-Jadidi R, Al Ali H, Rabbani N, Antonysunil A, Larkin J, Ahmed A, Rayman G, Bodmer CW. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. *Diabetologia* (2007) 50(10) ,2164-70.
4. 柴田克己. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金, 循環器等生活習慣病対策総合研究事業, 日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) に関する研究, 平成 18 年度総括・分担研究報告書. 2007.
5. K Shibata. Tryptophan-NAD metabolism in streptozotocin diabetic rats. *Agric.Biol. Chem.*(1988) 52(8) , 1993-1998.
6. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己. 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファンニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位, *食品衛生学雑誌* (2004) 45, 231-8.
7. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) 258 , 5623-8.
8. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 17th ed., (2000) AOAC Inc, Arlington, VA, USA, 55-7.
9. Gregory JF 3<sup>rd</sup>, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) 32 , 879-83.
10. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B<sub>12</sub> degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* (1998) 46 , 5177-80.
11. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424 , 23-8.
12. 柴田克己. 高速液体クロマトグラフィーによる尿中 N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドの超微量定量方法. *ビタミン* (1987) 61, 599-604.
13. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.
14. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* (1994) 40 , 491-8.
15. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for  $\alpha$ -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44,

361-70.

16. Yoshikawa S, Morinobu T, Hamamura K, Hirahara F, Iwamoto T, Tamai, H. The effect of g-tocopherol administration on  $\alpha$ -tocopherol levels and metabolism in humans. *Eur J Clin Nutr* (2005) 59 , 900-5.
17. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* (1976) 15(2) , 212-6.

表 1. STZ 糖尿病ラットにおける体重・飼料摂取量及び臨床検査値

	Control (n=5)	STZ (n=11)
Body weight gain (g)	186.94±3.78	80.2±7.30***
Total food intake (g)	430.44±7.56	675.82±9.53***
Food efficiency ratio	0.435±0.010	0.121±0.011***
Urine volume (mL/day)	13.2±0.8	302.9±9.6***
Urinary glucose (mg/dairy intake)	0.47±0.15	31.24±1.26***
Blood glucose (mg/dL)	93±42	849±256***
Plasma TG (mg/dL)	144±65	1142±435***
Plasma Total-cholesterol (mg/dL)	100±45	127±38
Urinary creatinine (mg/dL)	5.86±0.49	29.54±5.15***
TBARS (MDA nmoL/mL)	4.74±0.05	9.02±0.67***

値は全て平均±標準誤差で表した.

\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

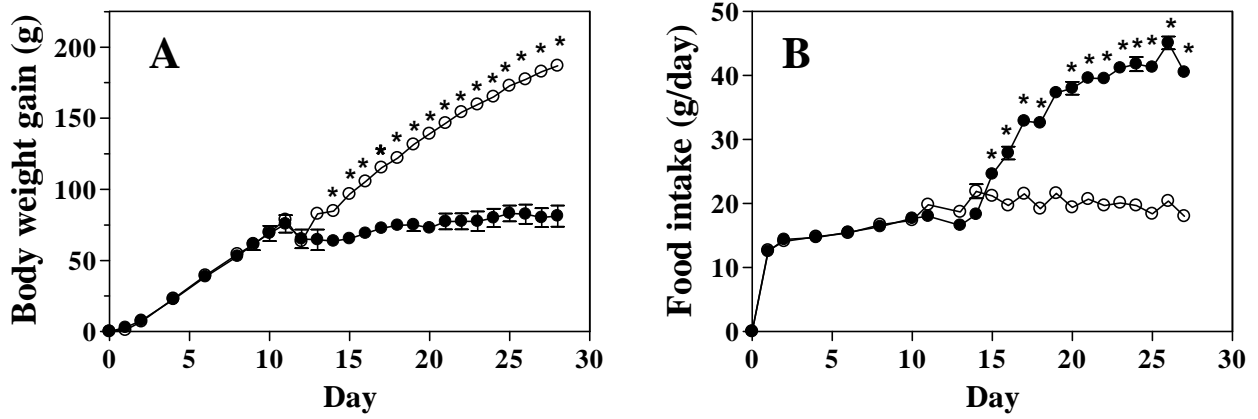
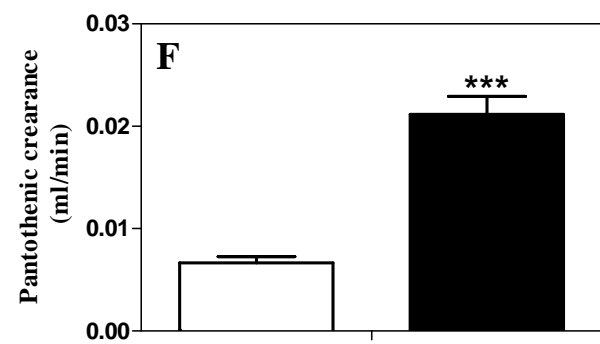
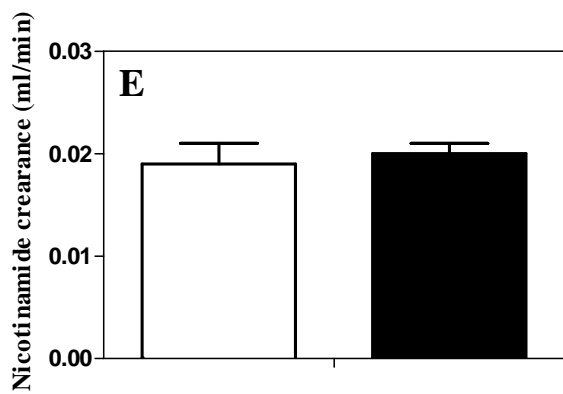
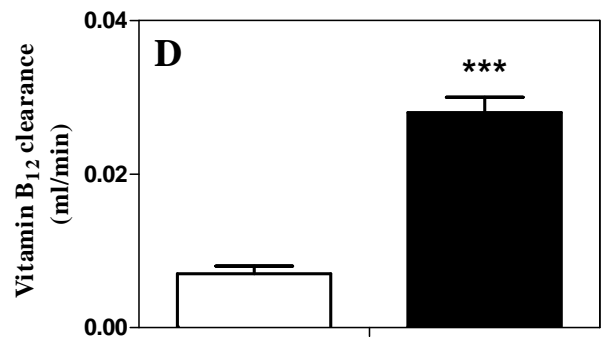
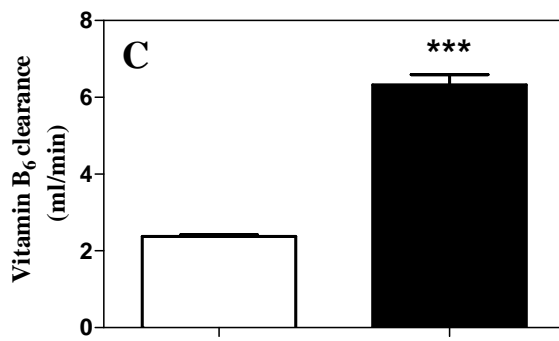
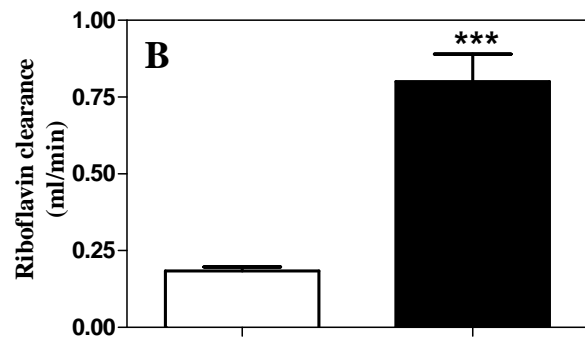
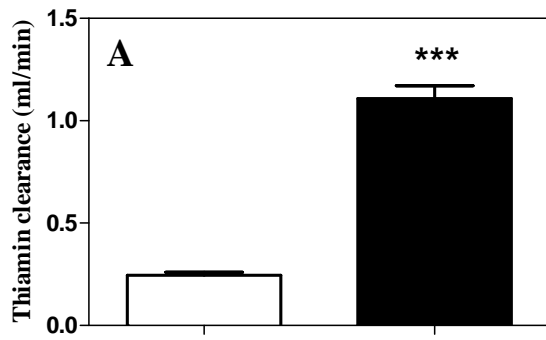


図1. STZ ラットにおける体重 (A) および飼料摂取量 (B)

対照群 (●), STZ 群 (○), の値は平均値±標準誤差として示した. 購入後, 予備飼育を行い, 11 日目~12 日目にかけて 16 時間の絶食をし, 12 日目に STZ (70mg/kg BW) を投与した.

\*はコントロールラットと STZ を投与したラットとの間に有意差があることを示す ( $p < 0.05$ ).



次項へ続く

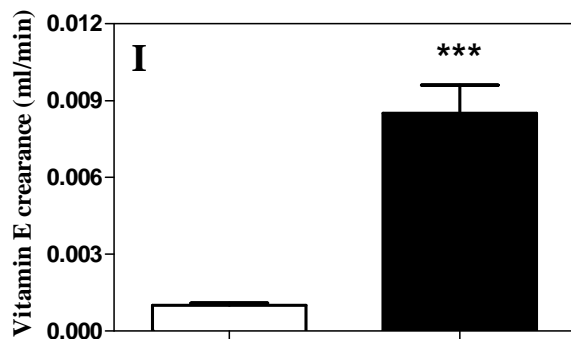
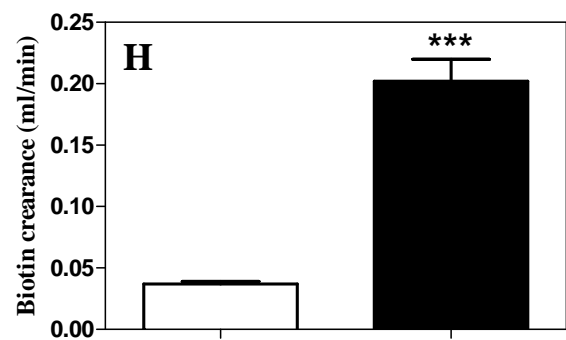
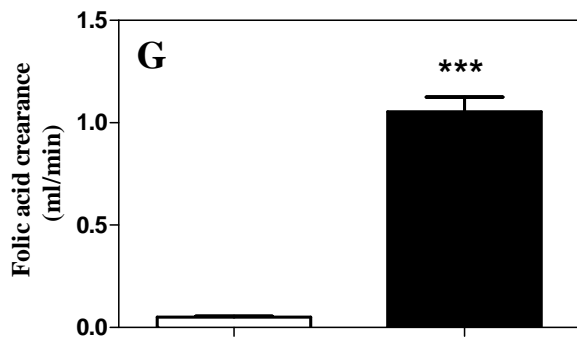


図2. STZにおけるビタミンB<sub>1</sub> (A), ビタミンB<sub>2</sub> (B), ビタミンB<sub>6</sub> (C), ビタミンB<sub>12</sub> (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H), ビタミンE (I) クリアランス

ビタミンクリアランス (mL/min) は, 24 時間尿中のビタミン排泄量 / (血中ビタミン濃度×1440) より算出した. □は対照群, ■はSTZ 群を表し, 値は平均値 ± 標準誤差として示した. 2 群間の有意差は \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  で示した.