

平成 21 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

主任研究者の報告書

8. 慢性腎不全におけるビタミン栄養状態

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

腎機能が低下した状態でのビタミン栄養状態を明らかにすることを目的として、アデニン硫酸塩を投与することによって慢性腎不全ラットモデル（腎不全モデルラット）を作製し、その血中ビタミン濃度、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。その結果、腎不全モデルラットでは、ビタミンクリアランスが高値を示すビタミン（ビタミン B₆ ビタミン B₁₂、ナイアシン）と低値を示すビタミン（ビタミン B₁、ビタミン B₂、葉酸、パントテン酸）が存在した。特に、ナイアシンに関しては血中、肝臓中濃度が低いにも関わらず、腎不全モデルラットにおいて尿中排泄量が高値であった。一方、パントテン酸に関しては血中濃度が高値ではあるが、尿中排泄量およびクリアランスは低値であった。これらの結果より腎機能が低下した状態では腎臓におけるビタミンの再吸収および濾過機能に異常が見られること、またそれはビタミンごとにより異なることが示唆された。

A. 目的

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金「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」で行ったストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラット実験にて, STZ ラットでは血中ビタミン濃度と尿中ビタミン排泄量より算出したビタミンクリアランスが高値を示すビタミンが存在することを明らかにした. つまり血中ビタミン濃度が低値を示すのは尿中に多く排泄されるためであることが示された. STZ 誘発糖尿病ラットでは, 腎機能低下も有することより, このクリアランスの上昇は腎機能低下による影響が考えられた.

本研究では, アデニン硫酸塩負荷により腎不全モデルラットを作成し, 腎機能が低下した状態での体内ビタミン栄養状態について検討した.

B. 実験方法

1. 動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた. 飼育室の温度は 22℃前後, 湿度は 50%前後, 午前 6 時～午後 6 時を明, 午後 6 時～午前 6 時を暗とした. 3 週齢雄性 Wistar ラットを 3 群に分け, Ctrl 群には 20% カゼイン食, Adenine 群には Ctrl 食に 0.75% アデニン硫酸塩を添加し, PF 群には Adenine 群の飼料制限食 (Ctrl 食) を与え, 30 日間飼育した. 飼料と水は自由摂取とし, 1 日ないし 2 日おきの午前 9 時～10 時に新しいものと交換した. また, その際に体重と飼料摂取量を測定した. 飼育最終日の 1 日尿および 1 日糞 (午前 10 時～翌日午前 10 時:24 時間) を集めた. 飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し, 血液を採取した. 肝臓, 腎臓を摘出

し, 各臓器重量を測定した. 血液, 肝臓, 腎臓, 尿はビタミン B₁, ビタミン B₂, ビタミン B₆, ビタミン B₁₂, ナイアシン, 葉酸, パントテン酸, ビオチンの測定に使用した.

2. ビタミンの定量方法

全血中総 VB₁ 濃度, 肝総 VB₁ 量は, チアミン, TMP, TDP, TTP の合計量とし, HPLC による分析に供した¹⁾. 尿中 VB₁ 量も HPLC により測定した¹⁾.

全血中総 VB₂ 濃度, 肝総 VB₂ 量はリボフラビン, FMN, FAD の合計量とした²⁾. リボフラビン, FMN, FAD はルミフラビンに光分解し, このルミフラビン量を測定した²⁾. 尿中 VB₂ 量の測定には, 尿をそのまま試料とし, HPLC による分析に供した²⁾.

血漿中ピリドキサルリン酸 (PLP) 濃度を HPLC により測定した³⁾. 肝総 VB₆ 量は *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 を用いた微生物定量法により測定した⁴⁾. 尿中 VB₆ 量として, ピリドキシン異化代謝産物である 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) 量を HPLC により測定した⁵⁾.

血漿中 VB₁₂ 濃度, 肝 VB₁₂ 量を測定するために, V.B₁₂ 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⁶⁾. 尿中 VB₁₂ 量の定量も同様に, 微生物学的定量法に供した⁶⁾.

全血中総 Nam 濃度, 肝総 Nam 量を定量するために, オートクレーブによって補酵素型ナイアシンを Nam に変換し, Nam を HPLC によって測定した⁷⁾. 尿中 Nam 代謝産物量は Nam, N¹-メチルニコチンアミド (MNA), 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) の合計とした. 尿を HPLC 法に供し, 尿中 Nam, 2-Py, 4-Py 各含量を測定した⁷⁾.

尿中 MNA 含量を HPLC 法で測定した⁸⁾.

肝総 PaA 量を求めるために、摘出した肝臓を 37℃で 7 時間置き、自己消化によって結合型 PaA を遊離型にし、*Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に肝ホモジネートを供した⁹⁾. 尿中 PaA 量の測定には尿を微生物学的定量法に供した⁹⁾.

血漿 FA 濃度の測定には、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物学的定量法に血漿を供した¹⁰⁾. 肝 FA 量を測定するために、ホモジネートをコンジュガーゼとプロテアーゼで処理することによって FA をプテロイルモノグルタミン酸に変換し、微生物学的定量法に供した¹⁰⁾. 尿中 FA 量も同様に、尿を微生物学的定量法に供した¹⁰⁾.

血漿総ビオチン濃度、肝総ビオチン量は、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法により測定した¹¹⁾. 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¹¹⁾.

3. 血中および尿中臨床パラメーターの測定

血漿中グルコースおよび BUN, クレアチニンの測定は、富士ドライケム (株) 富士フィルムを用いて測定した.

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. 統計処理

数値はすべて平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した. 値の比較には一元配置分散分析を用い、有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った. *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. 腎不全モデルラットにおける体重増加量・飼料摂取量および臓器重量の変化

実験期間中の飼料摂取量、体重増加量を図 1 に示した. 体重増加量、飼料摂取量において、Ctrl 群と Adenine 群、PF 群との間にそれぞれ約 1.0 倍, 1.8 倍の差が認められた. 一方、Adenine 群が摂取した飼料を与えた PF 群は体重増加量、飼料摂取量ともに差は認められなかった.

2. 臓器重量、血液および尿中臨床パラメーター

肝臓の重量は Ctrl 群に比べ、Adenine 群で減少し、Adenine 群と PF 群間には差は認められなかった. 一方、腎臓の重量は、Ctrl 群と PF 群間には差はなく、Adenine 群では PF 群の約 3.0 倍であった. また、BUN、血漿クレアチニン、尿中クレアチニン値より Ctrl 群、PF 群に比べ Adenine 群において腎機能の低下が認められた. (表 1)

2. 血液中ビタミン濃度

血液中のビタミン濃度を図 2 に示した. PF 群に比べ Adenine 群において低値を示したビタミンは、ビタミン B₆、ナイアシン、葉酸であった. 一方、高値を示したビタミンは、ビタミン B₂、パントテン酸であり、パントテン酸に関しては Adenine 群で PF の約 2.6 倍であった. ビタミン B₁、ビタミン B₁₂、ビオチンに関しては 2 群間で差は認められなかった.

3. 肝臓中ビタミン濃度

肝臓中のビタミン濃度を図 3 に示した. PF 群に比べ Adenine 群において低値を示したビタミンは、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ナイアシン、パントテン酸、ビオチンであった. 一方、高値を示したビタミンは、ビタミン

B₆, 葉酸であった。

4. 尿中ビタミン排泄量

尿中ビタミン排泄量を図 4 に示した。PF 群に比べ Adenine 群において低値を示したビタミンは、ビタミン B₁, ビタミン B₂, 葉酸, パントテン酸であった。一方, ナイアシンのみ高値を示した。ビタミン B₆, ビタミン B₁₂, ビオチンに関して差は認められなかった。

5. ビタミンクリアランス

ビタミンクリアランスを図 5 に示した。PF 群に比べ Adenine 群において低値を示したビタミンは、ビタミン B₁, ビタミン B₂, 葉酸, パントテン酸であった。一方, ビタミン B₆, ビタミン B₁₂, ナイアシンに関しては 2 群間で Adenine 群にてそれぞれ約 1.8 倍, 2.7 倍, 4.8 倍高値を示した。ビオチンに関しては, 2 群間で差は認められなかった。

D. 考察

ラットにアデニン硫酸塩を長期 (約 30 日間) 投与することにより直線的に高窒素血症が進行し, 腎結石や尿路結石を形成する。これがヒトの腎不全末期に似ていることより慢性腎不全モデルとして汎用されている¹²⁻¹⁴⁾。

本研究にて腎不全モデルラットでは, クリアランスが低値を示すビタミンが存在した。これは, STZ ラット実験から得られた結果に反する。一方, ビタミン B₆, ビタミン B₁₂, ナイアシンのクリアランスは腎不全モデルラットにて高値を示した。しかしながらビタミン B₁₂ の主要な排泄経路は尿ではないため単純にクリアランスで判断することはできないと考える。Yokozawa¹⁴⁾らは, アデニン硫酸塩長期投与ラットにおいて, 結晶成分が尿細管腔主に近位尿細管を中心に沈着するが腎糸球体への沈着は認められないことを明

らかにしている。つまり, 腎不全モデルラットでは糸球体機能は比較的維持されているが, 腎尿細管機能, 特に腎における再吸収機能が低下していることが考えられる。本研究より, ビタミン B₆, ナイアシンに関してはその影響を鋭敏に反映しており, 再吸収に関わるトランスポーターの発現が関与している可能性が考えられる。これまでの STZ ラットにおけるビタミンクリアランスの上昇は, 腎尿細管における再吸収能よりは, むしろ糸球体における過剰濾過による影響を大きく受けることが示唆された。

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

なし

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. 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.
2. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) 258, 5623-8.
 3. Rybak ME, Pfeiffer CM. Clinical analysis of vitamin B₆: determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem* (2004) 333, 336-44.
 4. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 17th ed., (2000) AOAC Inc, Arlington, VA, USA, 55-7.
 5. Gregory JF 3rd, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) 32, 879-83.
 6. 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 B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* (1998) 46, 5177-80.
 7. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
 8. 柴田克己. 高速液体クロマトグラフィーによる尿中 N¹-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.
 9. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.
 10. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44, 361-70.
 11. 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.
 12. Bendich A, Brown GB, Philips FS, Thiersch JB. The direct oxidation of adenine in vivo. *J Biol Chem* (1950) 183, 267-277.
 13. Philips FS, Thiersch JB, Bendich A. Adenine intoxication in relation to in vivo formation and deposition of 2,8-dioxyadenine in renal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* (1952) 104, 20-30.
 14. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* (1986) 44, 230-4.

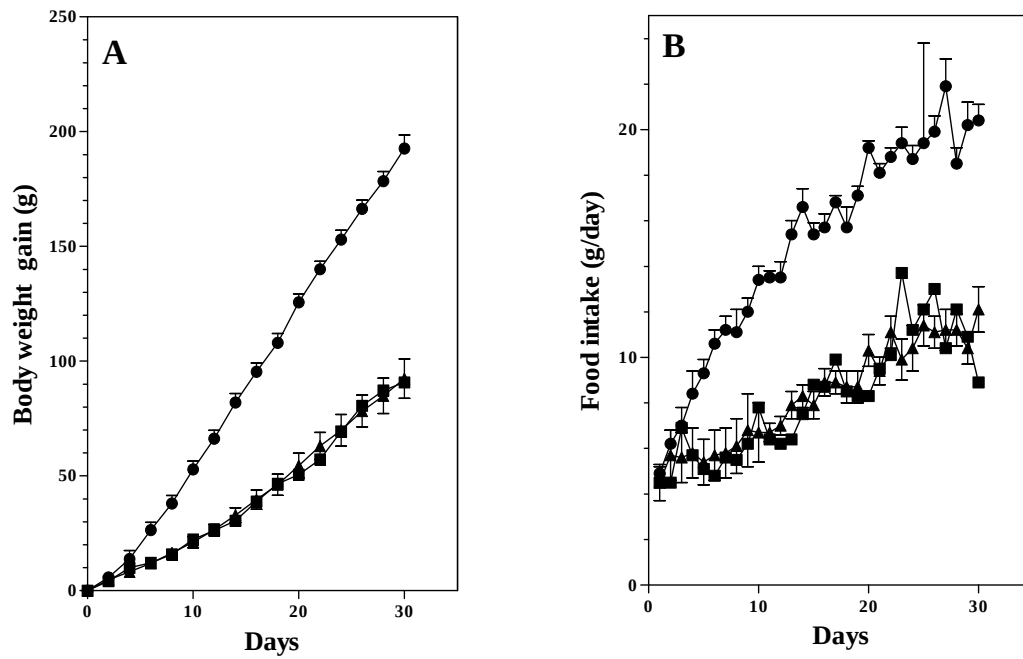


図 1. Adenine 投与における体重増加量 (A) および飼料摂取量 (B) の変化

● : Ctrl 群, ■ : PF 群, ▲ : Adenine 群.

値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した.

表 1 臓器重量, 血液および尿中臨床パラメーター

項目	Ctrl 群	PF 群	Adenine 群
肝臓重量 (g)	9.86 ± 0.24 ^a	4.24 ± 0.03 ^b	5.02 ± 0.23 ^b
腎臓重量 (g)	1.83 ± 0.02 ^a	1.15 ± 0.01 ^a	3.45 ± 0.13 ^b
BUN (mM)	7.2 ± 0.4 ^a	3.9 ± 0.4 ^a	31.8 ± 2.9 ^b
血漿クレアチニン (mM)	0.28 ± 0.01 ^a	0.33 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.02 ^b
尿中クレアチニン (mg/day)	9.61 ± 0.45 ^a	5.67 ± 0.21 ^b	4.84 ± 0.25 ^c
Ccr (mg/min)	0.21 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.01 ^b

値は平均値 ± 標準誤差として示した. 異なる添え字は有意差を示す.

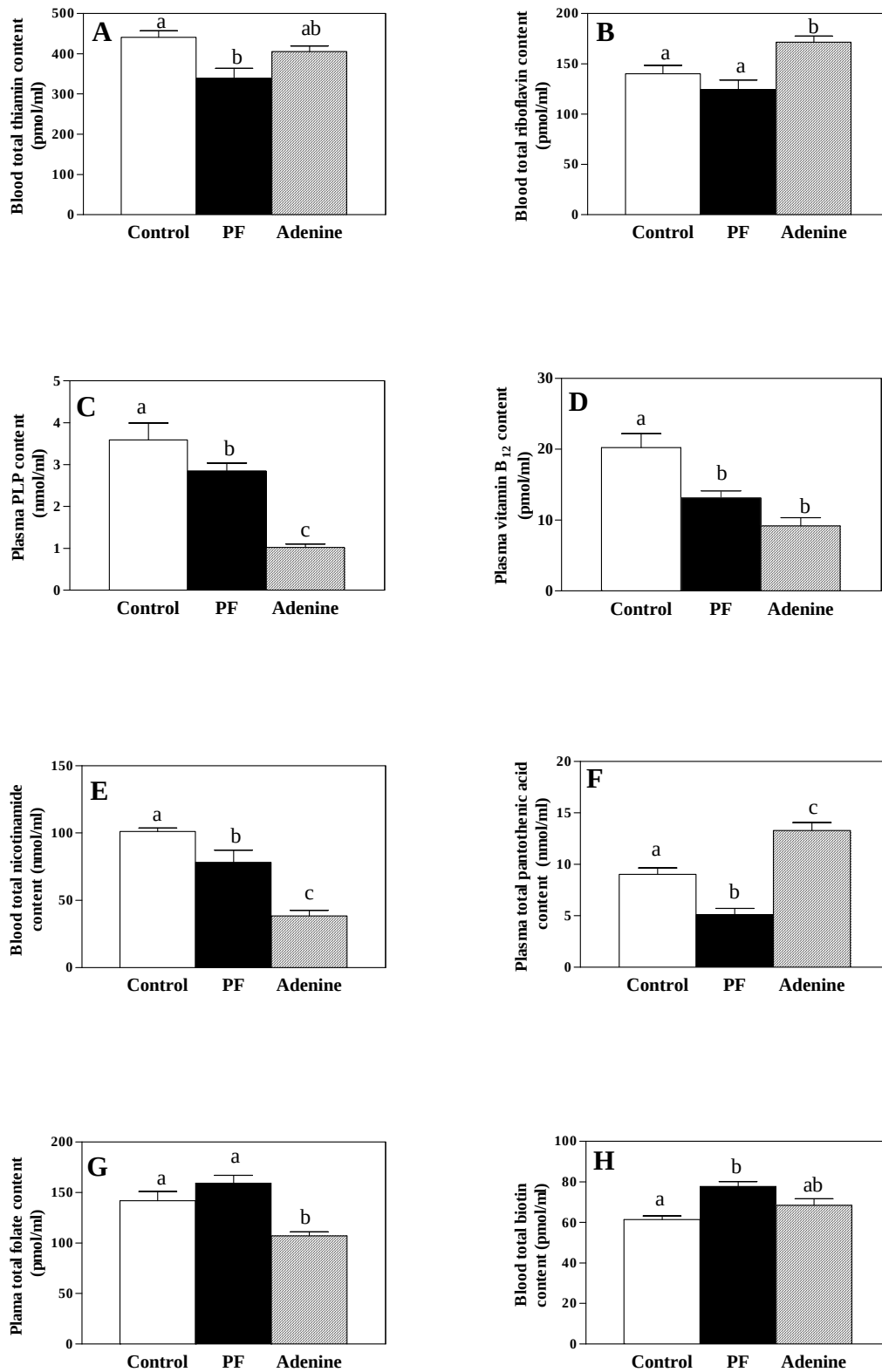


図 2. 血中ビタミン B₁ (A) ,ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ (C), ビタミン B₁₂ (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) 濃度.

値は平均値 ± 標準誤差として示した. 異なる添え字は有意差を示す.

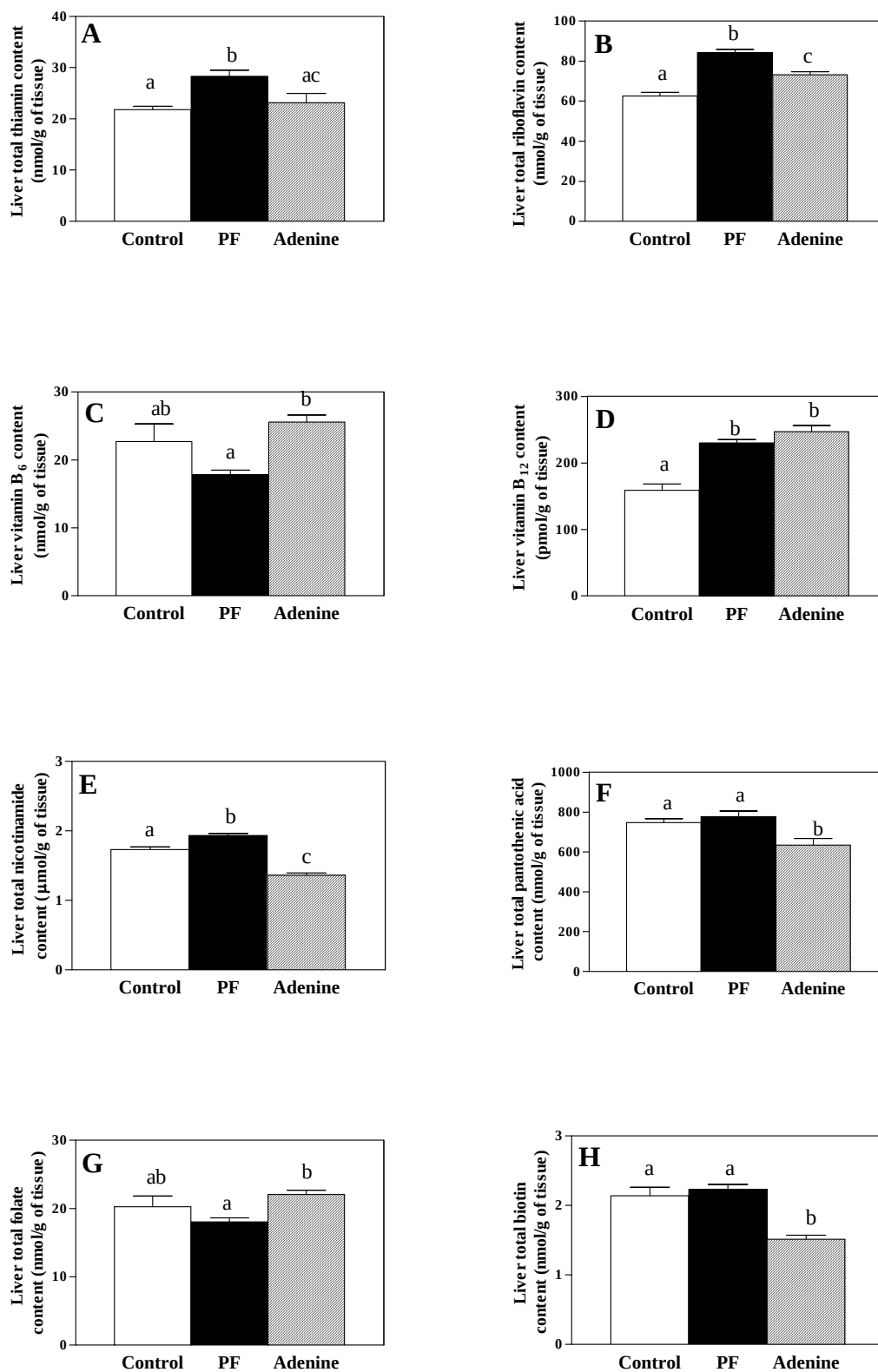


図 3. 肝臓中ビタミン B₁ (A) ,ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ (C), ビタミン B₁₂ (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) 濃度。
値は平均値 ± 標準誤差として示した。異なる添え字は有意差を示す。

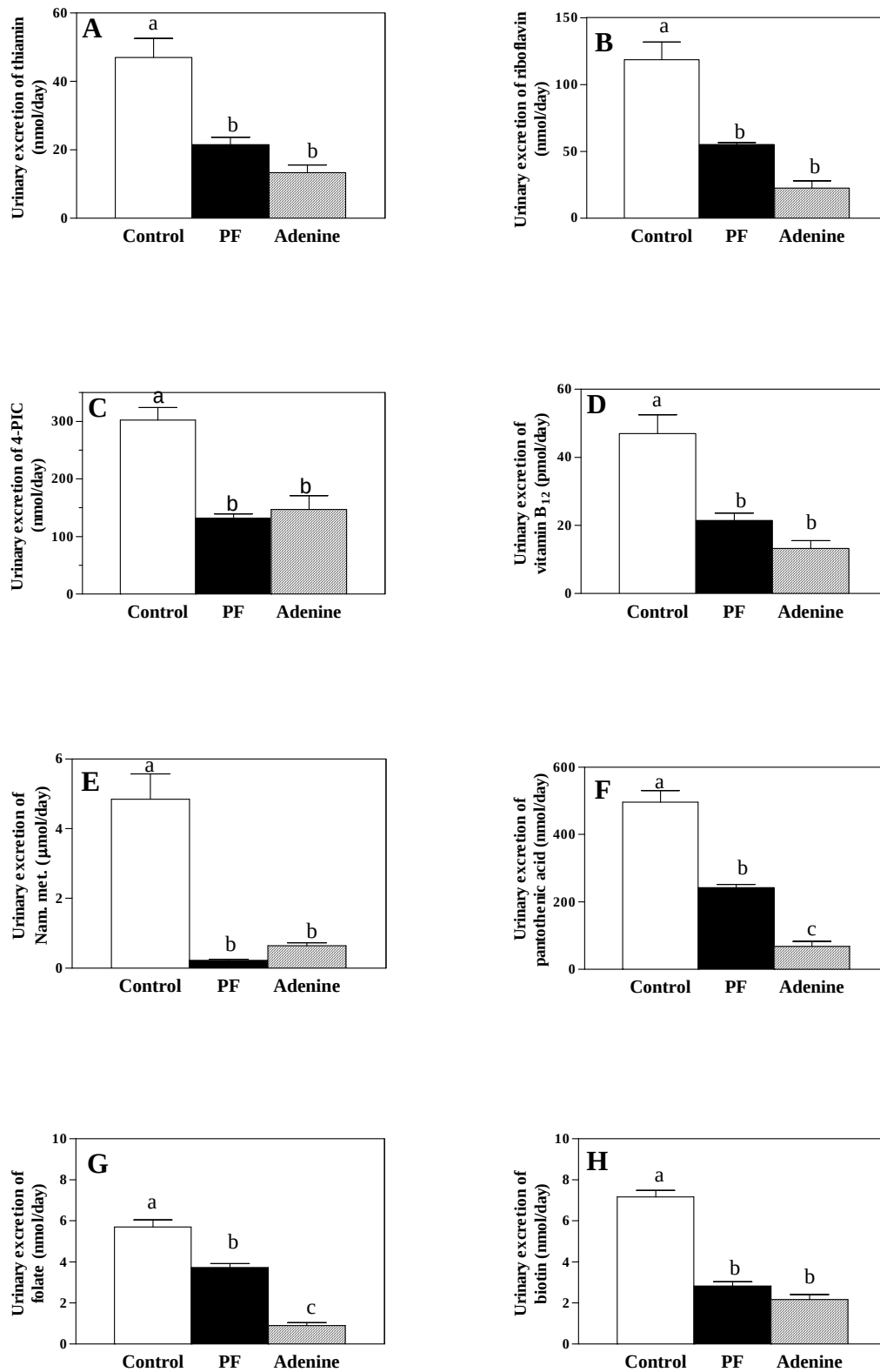


図 4. 尿中ビタミン B₁ (A) ,ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ (C), ビタミン B₁₂ (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) 排泄量.
値は平均値 ± 標準誤差として示した. 異なる添え字は有意差を示す.

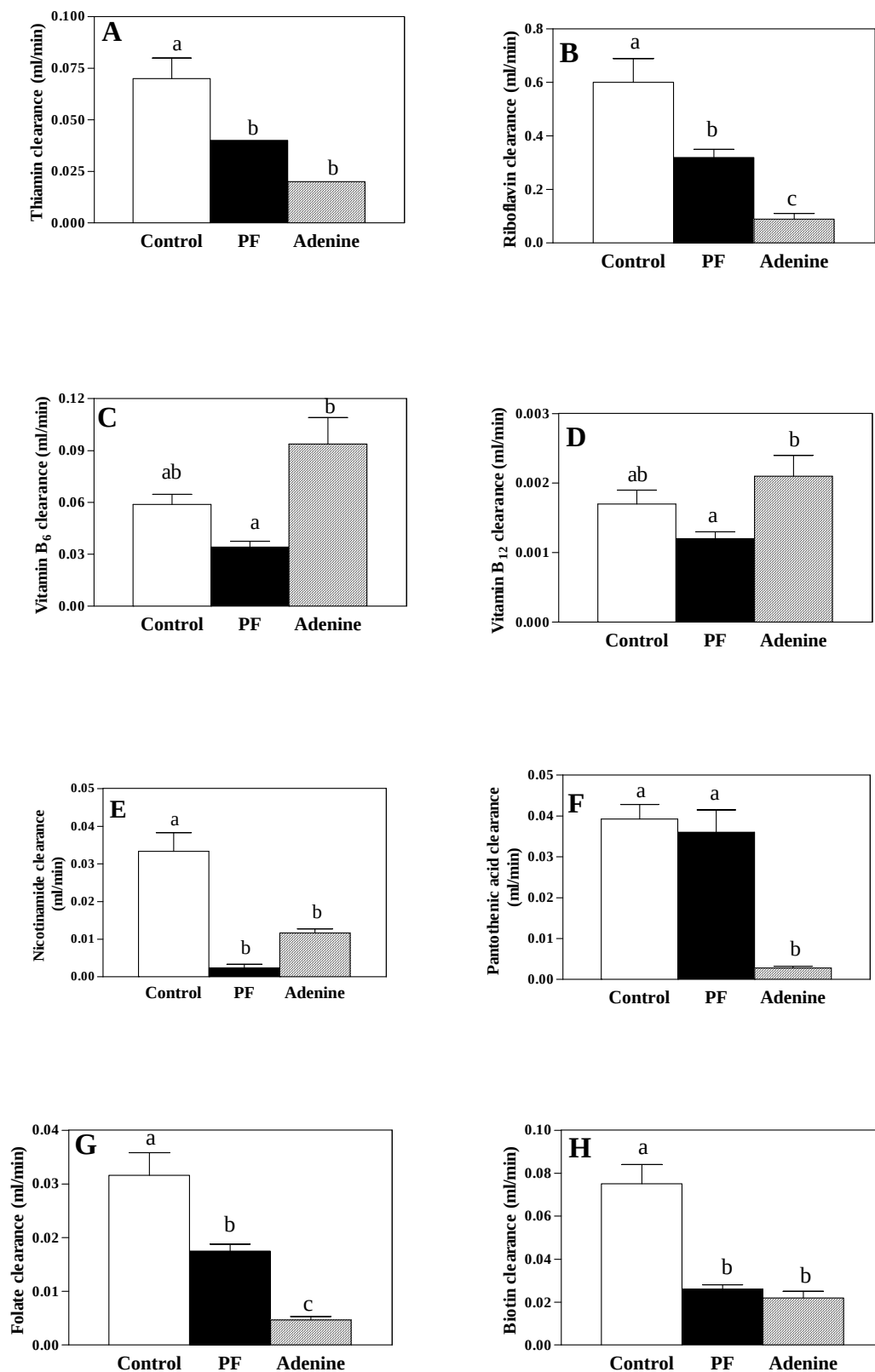


図 5. ビタミン B₁ (A) ,ビタミン B₂ (B), ビタミン B₆ (C), ビタミン B₁₂ (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) クリアランス。
値は平均値 ± 標準誤差として示した。異なる添え字は有意差を示す。