

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

## 12. ラットにおけるアルコール摂取時のビタミン必要量の変動

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

### 研究要旨

生化学的な背景において、アルコール過剰摂取により体内のビタミン貯蔵量が低下すると考えられている。しかし、アルコール摂取時のビタミン必要量に関する報告はない。

本研究では、ラットにおいて、エタノール摂取によりどの B 群ビタミン (ビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub>, ビタミン B<sub>6</sub>, ビタミン B<sub>12</sub>, ナイアシン, パントテン酸, 葉酸, ビオチン) の代謝が変動するのかを明らかにすること、また、アルコール摂取時に B 群ビタミンの必要量が増加するかどうかを明らかにすることを目的とした。3 週齢の Wistar 系ラットを用い、ビタミン混合 0.3%を含む 20%カゼイン食を与え 28 日間飼育した。対照群には水、試験群には 15%エタノールを与えた。飼育最終日の尿、血液、肝臓中のビタミン量を測定した。ビタミン B<sub>12</sub>を除く B 群ビタミンにおいて、尿、血液、肝臓中のビタミン量の値が試験群で低値を示し、エタノールの摂取によるビタミン代謝の変動が認められた。また、エタノール投与により、ビタミン B<sub>12</sub>を除く B 群ビタミンの尿中排泄率が減少した。これは、体内のビタミンの利用が高まったことが示している。これらのことから、ビタミン B<sub>12</sub>を除く 7 種類の B 群ビタミンにおいて、必要量が増加したことが示された。

## A. 目的

慢性アルコール摂取が原因でおこる脳障害は、脳中のビタミン B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ニコチンアミドの著しい減少を伴っているという報告がある<sup>1)</sup>。また、生化学的な背景においても、アルコールの過剰摂取により体内のビタミン貯蔵量が低下すると考えられている。ヒトと同様に、動物実験においてもエタノール投与により体内のビタミン量が減少するという報告がある<sup>2)</sup>。このことよりヒトの先行実験として、ラットを用い、アルコール摂取時の必要量算定に関する研究が可能ではないかと考えた。

本研究では、ラットにおいて、エタノール摂取によりどの B 群ビタミンの代謝が変動するのかを明らかにすることを目的とした。また、アルコール摂取時に B 群ビタミンの必要量が増加するかどうかを明らかにすることを目的とした。

## B. 実験方法

### 1. 飼育動物

本研究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°C 前後、湿度は 50% 前後、午前 6 時～午後 6 時を明、午後 6 時から午前 6 時を暗とした。

3 週齢の Wistar 系雄ラット 10 匹を日本クレア (株) より購入し、平均体重がほぼ等しくなるように対照群 (control 群) と試験群 (ethanol 群) の 2 群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。対照群には水、試験群には 15% エタノールを与えた。飼料はビタミン混合を 0.3% 含む 20% カゼイン食 (V.mix 0.3%) を与え、28 日間飼育した。飼料と水・エタノールは自由摂取とし、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 3 日間の 1 日尿を集め、尿中ビタミン排泄量を測定した。血液、肝臓は断頭屠殺時に採取、摘出し、血液中のビタミン濃度、肝臓中のビタミン量を測定した。

### 2. 分析

尿中チアミン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>3)</sup>。

尿中リボフラビン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>4)</sup>。

尿中 4-ピリドキシン酸 (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>5)</sup>。

尿中ビタミン B<sub>12</sub> 量の定量するために、シアノコバラミンに変換後、*Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法に供した<sup>6)</sup>。

尿中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>7)</sup>。また、尿中 MNA 含量を HPLC 法で測定した<sup>8)</sup>。

尿中パントテン酸量を測定するために、尿を *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に供した<sup>9)</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、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用

いて微生物学的定量法に供した<sup>10)</sup>.

尿中ビオチン量を測定するために、尿を *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に供した<sup>11)</sup>.

### 3. 統計処理

2 群間の比較には unpaired *t*-test を用いた。 *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。データは平均 ± 標準誤差で示した。

## C. 結果

### 1. 体重増加量, 飼料摂取量, エネルギー摂取量, 飼料効率

体重増加量, 飼料摂取量, エネルギー摂取量, 飼料効率の結果は図 1 に示した。

体重増加量, 飼料摂取量は, 対照群と比較して, 試験群で低い値を示した。エネルギー摂取量は, 対照群と試験群の差は認められなかった。

飼料効率は飼料摂取量 / 体重増加量から算出した。飼料効率は, 対照群と試験群で差は認められなかった。

### 2. 尿中ビタミン排泄量, 血液中ビタミン濃度, 肝臓中ビタミン量

尿中ビタミン排泄量の結果は図 2 に示した。対照群と試験群で, 飼料摂取量に差が認められたため, ビタミン排泄量は, 排泄率 (尿中ビタミン排泄量 / ビタミン摂取量 × 100) で表した。尿中ビタミン排泄率は, ビタミン B<sub>12</sub> を除く 7 種類の B 群ビタミンで, 対照群と比べ, 試験群で低い値を示した。

血液中のビタミン濃度は, ビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub>, ビタミン B<sub>6</sub>, ナイアシン, パン

トテン酸において, 対照群と比べ, 試験群で低い値を示した (図 3)。

肝臓中のビタミン量は, ビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub> において対照群と比べ試験群で低い値を示した (図 4)。

## D. 考察

本研究では, ラットにエタノールを慢性的に摂取させ, エタノール摂取によりどの B 群ビタミンの代謝が変動するのか, また, エタノール摂取によりビタミンの必要量は上昇するのかどうか調べた。

長期エタノール投与では, エタノールによるエネルギー摂取のため, 飼料摂取量が減少する。しかし, 飼料効率 (飼料摂取量 / 体重増加量) に差がなかったことより, エタノール摂取によるエネルギー摂取量は体重増加に寄与していないことが示され, Pirola ら<sup>12)</sup> の報告と一致する結果となった。

尿中ビタミン排泄率, 血液中ビタミン濃度, 肝臓中ビタミン排泄量の結果から, ビタミン B<sub>12</sub> を除く 7 種類の B 群ビタミンで, エタノール投与によるビタミンの代謝の変動が認められた。肝臓中のビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub>, パントテン酸, 葉酸が試験群で減少することから, 慢性的なエタノール摂取により体内の貯蔵量が減少したことを示している。また, それに伴い血液中のビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub>, パントテン酸濃度が, エタノール投与により一定に保たれていないことから, エタノール投与により, 体内のビタミンの栄養状態が悪化していることが示された。

また, 3 週齢ラットでは, 0.3% のビタミン混合食が全てのビタミンの必要量を満たす量として, 平成 19 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－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランス解明－<sup>13)</sup>で行われた実験で決定されていることから、本研究で行った V.mix 0.3%群がビタミン必要量摂取群とした。この対照群とエタノールを投与した試験群を比較すると、ビタミン B<sub>12</sub>を除く7種類のB群ビタミンにおいて、尿中排泄率は試験群で低い値を示した。尿中ビタミン排泄率の減少は、体内のビタミンの利用が高まったことが示される。このことから、エタノール投与によりビタミン B<sub>12</sub>を除く7種類のB群ビタミン必要量が増加したことが示された。

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

宮崎愛子, 福渡努, 柴田克己. 第13回日本病態栄養学会. 平成22年1月10日(国立京都国際会館)エタノールの投与がビタミン必要量におよぼす影響.

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. Ryle PR, Thomson AD. Nutrition and vitamins in alcoholism. *Contemporary issues in clinical biochemistry* (1984) 1, 188-244.
2. Beth CI, Colleen MS. Effects of Acute and Chronic Ethanol Ingestion on Pantothenate and CoA Status of Rats. *J Nutr* (1987) 117, 443-51.
3. 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.
4. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) 258, 5623-8.
5. 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.
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 B<sub>12</sub> 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, 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.
8. 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.

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  $\alpha$ -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44, 361-70.
11. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. Agarplate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* (1994) 40, 491-8.
12. Pirola RC, Lieber CS. The energy cost of the metabolism of drugs, including ethanol. *Pharmacology* (1972) 7, 185-196.
13. 柴田克己, 平成 19 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－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランス解明－, 平成 19 年度総括・分担研究報告書. (2008)

14.

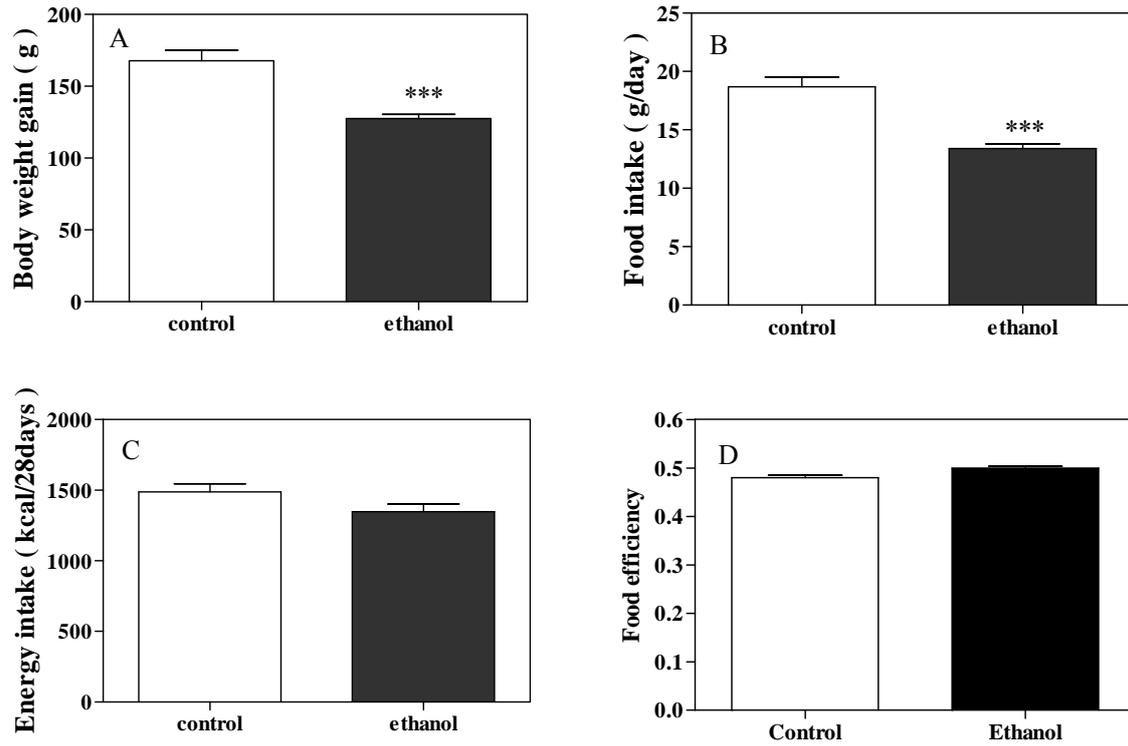


図 1. エタノール摂取が体重増加量 (A) , 飼料摂取量 (B) , エネルギー摂取量 (C) , 飼料効率 (D) におよぼす影響.

□は対照群 (Control 群) , ■は試験群 (ethanol 群) を表し, 値は平均値 ± 標準誤差として示した. \*は有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) .

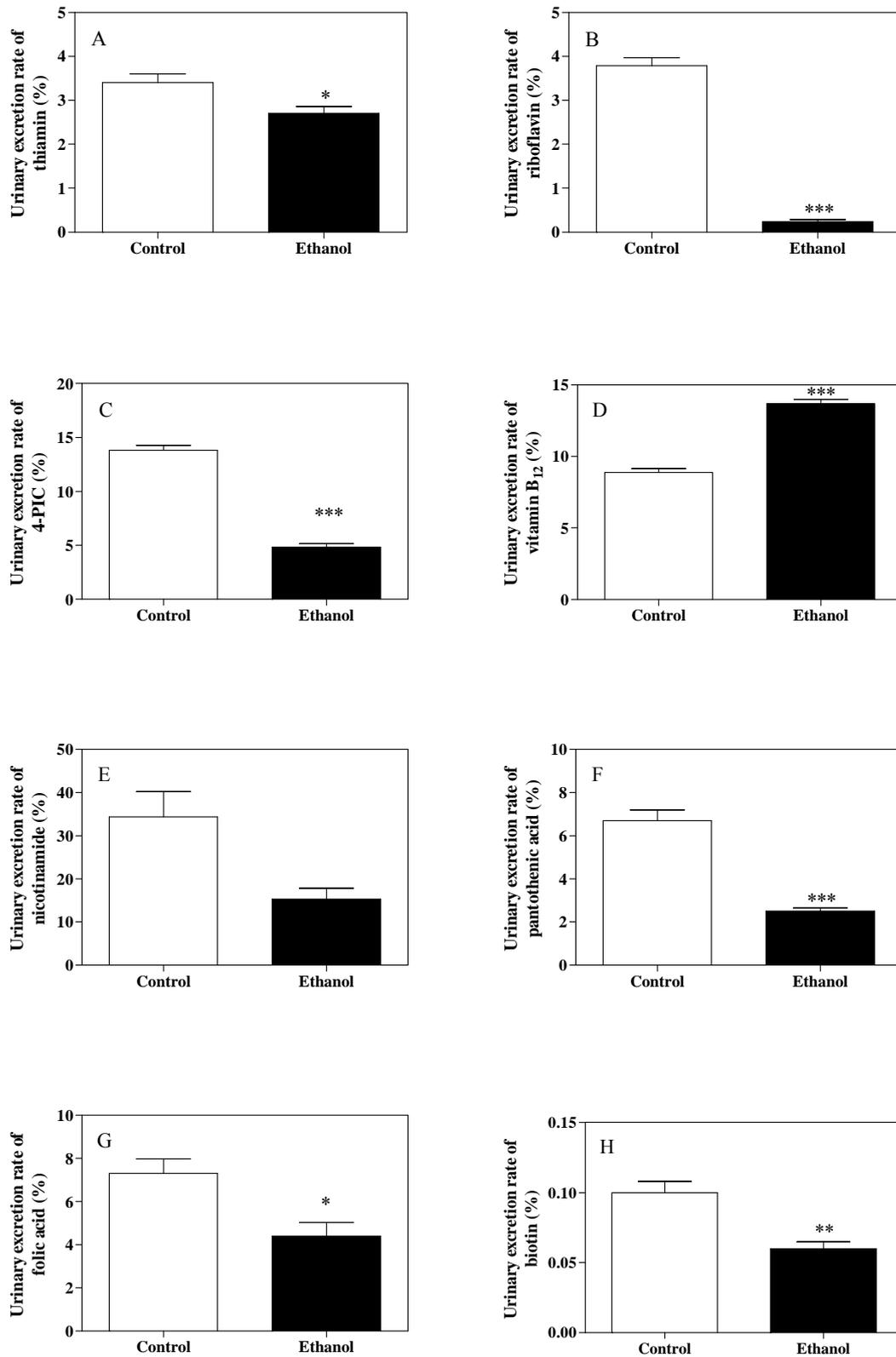


図2. エタノール摂取が尿中ビタミン B<sub>1</sub> (A), ビタミン B<sub>2</sub> (B), ビタミン B<sub>6</sub> (C), ビタミン B<sub>12</sub> (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) 排泄量におよぼす影響. □は対照群 (Control 群), ■は試験群 (ethanol 群) を表し, 値は平均値 ± 標準誤差として示した. \*は有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

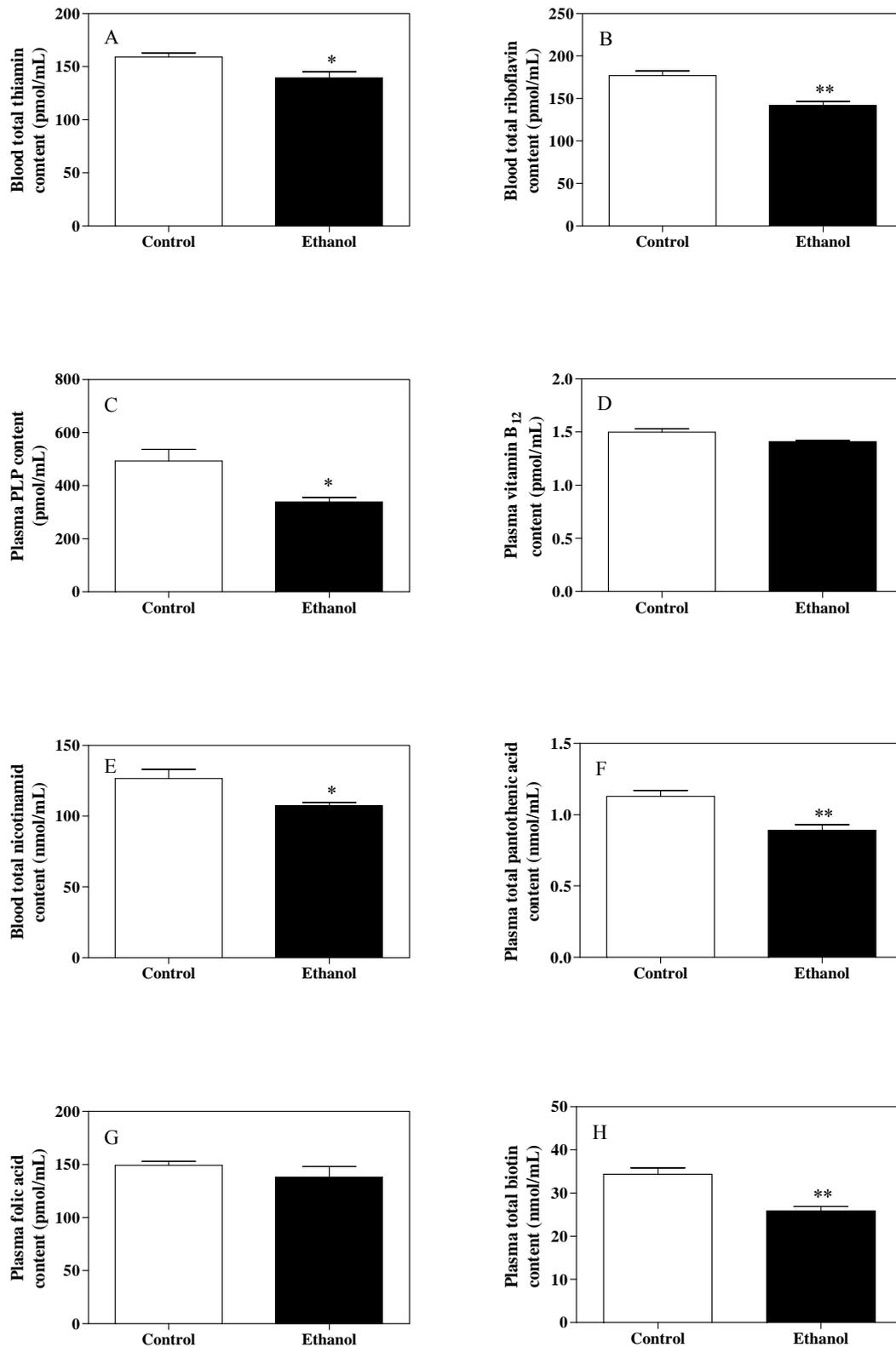


図3. エタノール摂取が血液中ビタミンB<sub>1</sub> (A), ビタミンB<sub>2</sub> (B), ビタミンB<sub>6</sub> (C), ビタミンB<sub>12</sub> (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) の濃度におよぼす影響. □は対照群 (Control 群), ■は試験群 (ethanol 群) を表し, 値は平均値 ± 標準誤差として示した. \*は有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

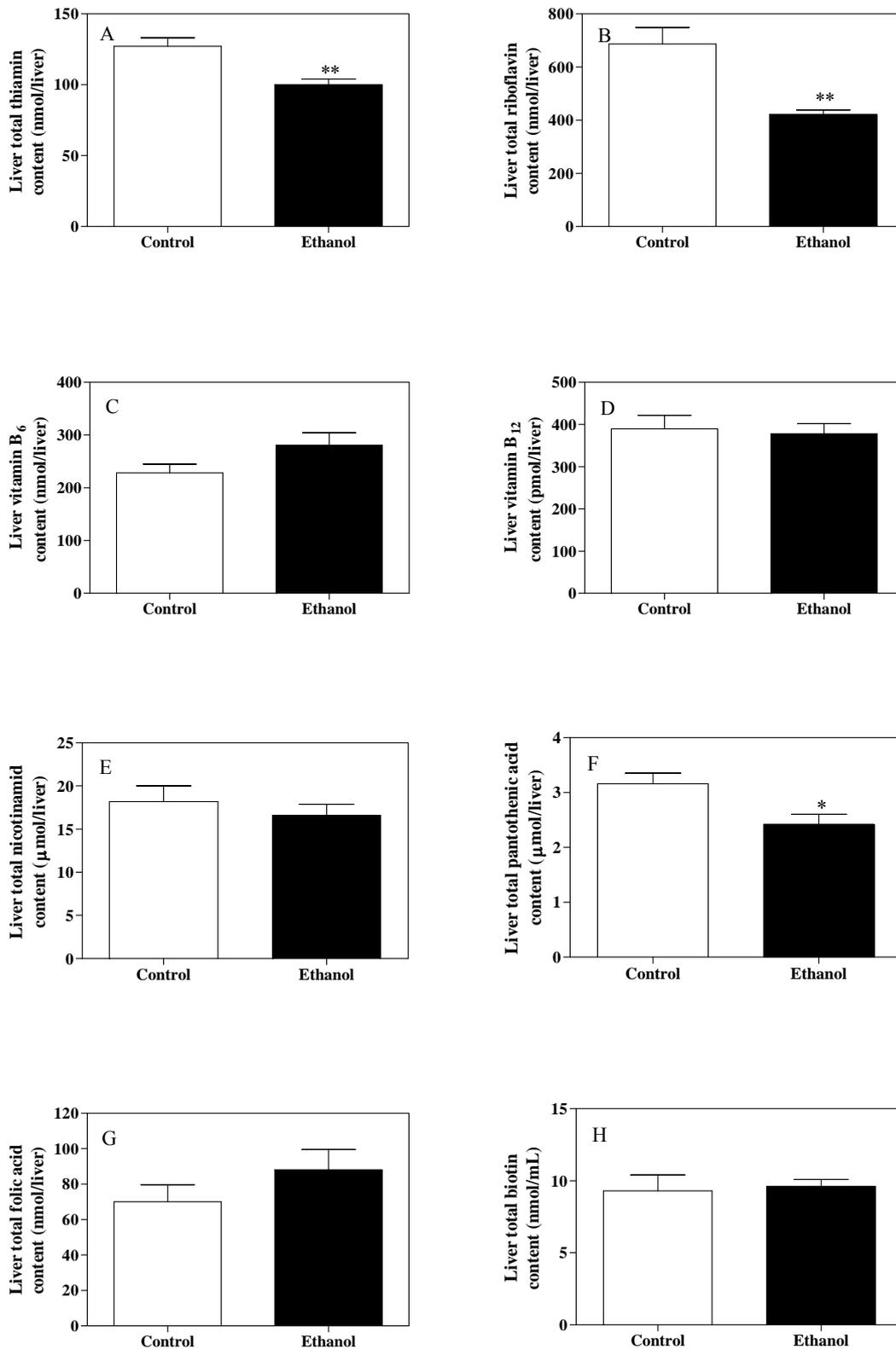


図 4. エタノール摂取が肝臓中ビタミン B<sub>1</sub> (A) , ビタミン B<sub>2</sub> (B) , ビタミン B<sub>6</sub> (C) , ビタミン B<sub>12</sub> (D) , ナイアシン (E) , パントテン酸 (F) , 葉酸 (G) , ビオチン (H) 量におよぼす影響. □は対照群 (Control 群) , ■は試験群 (ethanol 群) を表し, 値は平均値 ± 標準誤差として示した. \*は有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).