

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

14. ラットにおけるビタミン B₁ 必要量の算定

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

ビタミン B₁ 代謝はエネルギー消費量，炭水化物摂取，アルコール摂取など様々な要因の影響を受ける可能性が指摘されている．これらの可能性について実験的に検証するためには，低ビタミン B₁ 栄養状態のヒトあるいは実験動物を対象とする必要がある．しかし，低ビタミン B₁ 栄養状態のヒトを対象とした介入試験を行うことは，倫理的な問題がある．本研究では，低ビタミン B₁ 栄養状態のラットを作製し，ビタミン B₁ に関わる生体指標を明らかにするために，ラットのビタミン B₁ 必要量を算定することを目的とした．3 週齢の Wistar 系雄ラットに，飼料 1 kg あたり 0, 0.5, 0.7, 0.8, 1.0, 6.0 mg のチアミン塩酸塩を含む食餌を与え，4 週間飼育した．この間の体重増加量と飼料摂取量を測定した．飼育終了後，ラットを屠殺し，血液および各臓器における総チアミン濃度を測定した．0.7 mg/kg diet 以下のチアミン塩酸塩摂取によって成長抑制が認められた．ビタミン B₁ 欠乏の典型的な症状は食欲不振とそれに伴う成長抑制であることから，成長抑制を指標としてビタミン B₁ 必要量を算定すると，0.8 mg/kg diet チアミン塩酸塩の摂取，すなわちチアミン塩酸塩として 80 µg/kg 体重/日が必要量となった．0.8 mg/kg diet チアミン塩酸塩を摂取したラットにおける血中総チアミン濃度は約 100 µmol/mL，肝総チアミン量は約 35 nmol/tissue であった．

A. 目的

尿中の水溶性ビタミン排泄量は環境や食事の変化に伴って鋭敏に変化する。一方、健康体であれば血中ビタミン濃度には変化が現れにくい。そのため、栄養状態の指標すなわち個人が有する最高能力を発揮するための栄養素摂取量を提言するための指標としてもつばら尿を試料として利用してきた。そのため、尿のデータは蓄積され、ヒトにおける尿中の水溶性ビタミンに関しては、暫定値ではあるが基準値が定めることができた¹⁾。しかしながら、将来的に疾患モデル動物などを扱うことを考えると、血中や臓器中のビタミン濃度の変化も視野に入れる必要がでてきた。

ビタミン B₁ (VB₁) は代謝の速いビタミンであり、運動、アルコール、炭水化物摂取などの要因によって VB₁ 代謝が影響を受ける可能性が指摘されている²⁻⁴⁾。これらの要因による VB₁ 代謝の変動は、劇的なものではないことが推察される。したがって、これらの要因について実験的に検証するためには、低 VB₁ 栄養状態のヒトあるいは実験動物を対象とし、さらなる VB₁ 栄養状態の悪化を指標とすればよい。しかし、低 VB₁ 栄養状態のヒトを対象として介入試験を行い、さらに VB₁ 栄養状態の悪化を招くことは倫理上の問題がある。本研究では、低ビタミン B₁ 栄養状態のラットを作製し、ビタミン B₁ に関わる生体指標を明らかにするために、ラットのビタミン B₁ 必要量を算定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。飼育室の温度は 22℃前後、湿度は 50%前後、午前 6 時から午後 6 時までを明、午前 6 時から午後 6 時までを暗とした。3 週齢の Wistar 系雄ラットを日本クレア (株) より 31 匹購入し、1 匹ずつラット用代謝ケージ (CT-10, 日本クレア (株), 東京) に入れ、28 日間飼育した。20%カゼイン食 1 kg あたりに含まれる VB₁ 量をチアミン塩酸塩として 0 mg, 0.5 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 1.0 mg, 6.0 mg とした飼料をラットに与えた (表 1)。飼料と水は自由摂取とし、1 日ないし 2 日おきに新しいものと交換した。ラットの世話は、午前 9 時に行い、体重と飼料摂取量を測定した。飼育終了後に断頭屠殺し、採血した。また、大脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣および大腿四頭筋を摘出し、各臓器重量を測定した。尿、血液、大脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、精巣および大腿四頭筋に含まれる VB₁ 量を測定した。

2. 分析

全血、肝臓、全脳、心臓、腎臓、脾臓、精巣、骨格筋中の総チアミン量は、チアミン、TMP、TDP、TTP の合計量とし、HPLC 法により分析した⁵⁾。

3. 統計処理

数値はすべて平均±標準偏差 (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なった。 $p < 0.05$ のとき統計学的有意差があるものとした。計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) GraphPad Prism4 を使用した。

C. 結果

1. 飼料摂取量および体重増加量

標準飼料に用いられる 6.0 mg/kg チアミン塩酸塩食を摂取したラットに比べ、0.5 mg/kg 以下のチアミン塩酸塩食を摂取したラットにおいて明らかな食欲減退と成長抑制が認められ、0.7 mg/kg チアミン塩酸塩食を摂取したラットにおいても食欲減退と成長抑制が認められた (図 1)．VB₁ 欠乏の典型的な症状は食欲不振とそれに伴う成長抑制であることから、成長抑制を指標として VB₁ 必要量を算定すると、0.8 mg/kg チアミン塩酸塩食の摂取、すなわち必要量はチアミン塩酸塩として 80 µg/kg 体重/日となった。

2. 血中および臓器中の総チアミン量

飼育終了後の全血、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、大腿四頭筋における総チアミン量を測定した。0～1.0 mg/kg チアミン塩酸塩食を摂取したラットにおける血中総チアミン濃度は、6.0 mg/kg チアミン塩酸塩食摂取ラットよりも低値を示した (図 2A)．しかし、0～1.0 mg/kg では飼料中のチアミン塩酸塩の含量にかかわらず一定値を示し、その値は約 100 pmol/mL であった。

肝総チアミン量についても同様に、0～1.0 mg/kg チアミン塩酸塩食を摂取したラットの値は 6.0 mg/kg チアミン塩酸塩食を摂取したラットより低値を示した (図 2B)．しかし、0～1.0 mg/kg では飼料中のチアミン塩酸塩の含量にかかわらず一定値を示し、その値は約 35 nmol/tissue であった。

その他の臓器における総チアミン量の変動は 2 通りのパターンに分けられた。飼料中のチアミン塩酸塩含量依存的に総チアミン量が増加した臓器は、脳、脾臓、精巣であった (図 2C, E, G)．血中総チアミン濃度を反映した臓器は、心臓、腎臓、骨格筋であった (図 2D, F, H)．

D. 考察

本研究では、ラットにおける VB₁ 必要量を算定することを目的として、幼若ラットに 0～6.0 mg/kg チアミン塩酸塩食を摂取させ、体重増加量、飼料摂取量、血中および臓器中総チアミン量を測定した。VB₁ 欠乏の典型的な症状である成長抑制を指標として必要量を算定すると、0.8 mg/kg 以上のチアミン塩酸塩食の摂取によって最大成長が認められたことから、ラットの VB₁ 必要量はチアミン塩酸塩として 80 µg/kg 体重/日となった。本研究と同様に、最大成長を指標としてラットの VB₁ 必要量を 0.55 mg/kg チアミン食と算定した報告がある⁶⁾。この値をチアミン塩酸塩に換算すると、0.7 mg/kg に相当する。本研究で得られた 0.8 mg/kg とほぼ同じ値ではあるが、本研究では 0.7 mg/kg チアミン塩酸塩食の摂取では成長遅延が認められた。この違いが認められた原因として、Wistar 系と SD 系という系統の違い、実験開始時期が 3 週齢と体重 90 g という違いが可能性として挙げられる。体重 90 g のラットは 4～5 週齢に相当することから、離乳後の 1～2 週間に VB₁ を貯えることができたため、その VB₁ を枯渇させるためにはより低含量の飼料を与える必要があったという可能性が考えられる。いずれにせよ、本研究により、3 週齢の Wistar 系ラットを用いる場合には、0.8 mg/kg チアミン塩酸塩食が VB₁ 必要量に相当する食餌であることを明らかにした。

本研究では、血液、肝臓を始めとする様々な臓器における総チアミン量を測定することにより、必要量の VB₁ を摂取したラットの生体指標を明らかにした。VB₁ の貯蔵組織は肝臓であり、VB₁ は血流を介して他の

臓器へ供給される。VB₁ 欠乏によって成長抑制が生じる機構は不明ではあるが、本研究より、VB₁ 欠乏を防ぐためには血中総チアミン濃度を 100 pmol/mL, 肝総チアミン量を 35 nmol/tissue に維持することが重要であるようである。

本研究により、ラットにおける VB₁ 必要量を算出し、その生体指標を明らかにした。VB₁ 代謝に影響をおよぼす可能性のある要因はいくつか指摘されている。したがって、本研究結果に基づいて作製した低 VB₁ 栄養状態のラットを用い、それらの要因の負荷によって VB₁ に関する生体指標の変動を調べれば、その要因が VB₁ 代謝におよぼす影響を実験的に証明することが可能となる。動物実験で得られた知見に基づいて VB₁ 必要量に影響をおよぼす要因の仮説を立て、疫学研究などによってその仮説を検証すれば、ヒトにおける VB₁ 必要量に影響をおよぼす要因を明らかにすることができる。

E. 健康危険情報

特記する情報なし

F. 研究発表

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. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto M, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N. Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J Nutr Sci Vitaminol* (2005) 51, 319-28.
2. Manore MM. Effect of physical activity on thiamine, riboflavin, and vitamin B₆ requirements. *Am J Clin Nutr* (2000) 72, 598-606.
3. Hoyumpa Jr AM, Nichols SG, Wilson FA, Schenker S. Effect of ethanol on intestinal (Na, K) ATPase and intestinal thiamine transport in rats. *J Lab Clin Med* (1977) 90, 1086-95.
4. Elmadfa I, Majchrzak D, Rust P, Genser D. The thiamine status of adult humans depends on carbohydrate intake. *Int J Vitam Nutr Res* (2001) 71, 217-21.
5. 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.
6. Rains TM, Emmert JL, Baker DH, Shay NF. Minimum thiamin requirement of weanling Sprague-Dawley outbred rats. *J Nutr* (1997) 127, 167-70.

表 1 飼料組成 (%)

	チアミン含量 (mg/kg 食)					
	0	0.5	0.7	0.8	1.0	6.0
カゼイン	20	20	20	20	20	20
L-メチオニン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
コーンスターチ	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9
ミネラル混合 (AIN-93M)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
コーン油	5	5	5	5	5	5
ショ糖	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4	23.4
VB ₁ 欠ビタミン混合 (AIN-93VX)	1	1	1	1	1	1
チアミン塩酸塩	0	0.0005	0.0007	0.0008	0.001	0.006

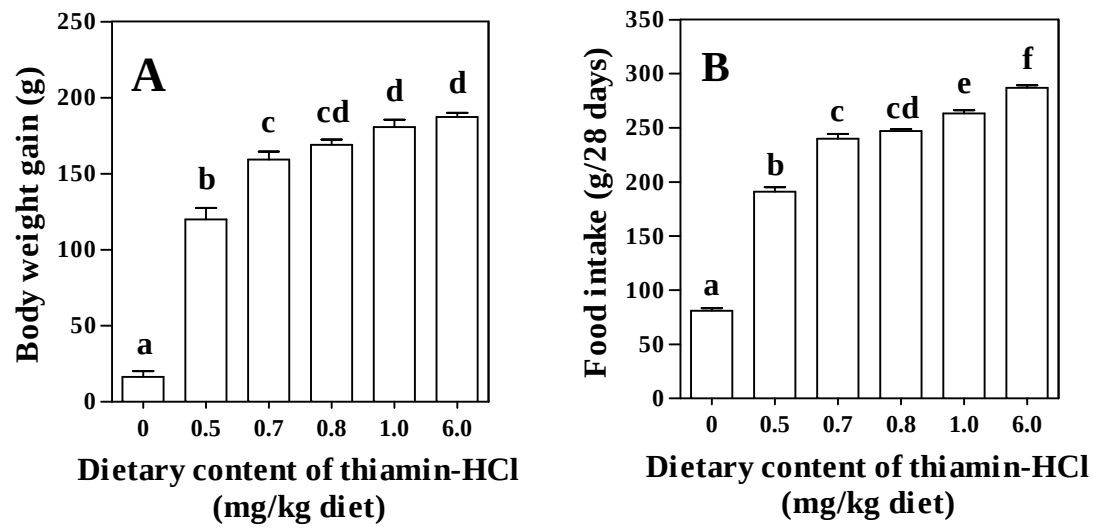


図 1. 体重増加量 (A) および飼料摂取量 (B)

値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 4 \sim 6$) として示した. 異なる添え字間で $p < 0.05$ の有意差があることを示す.

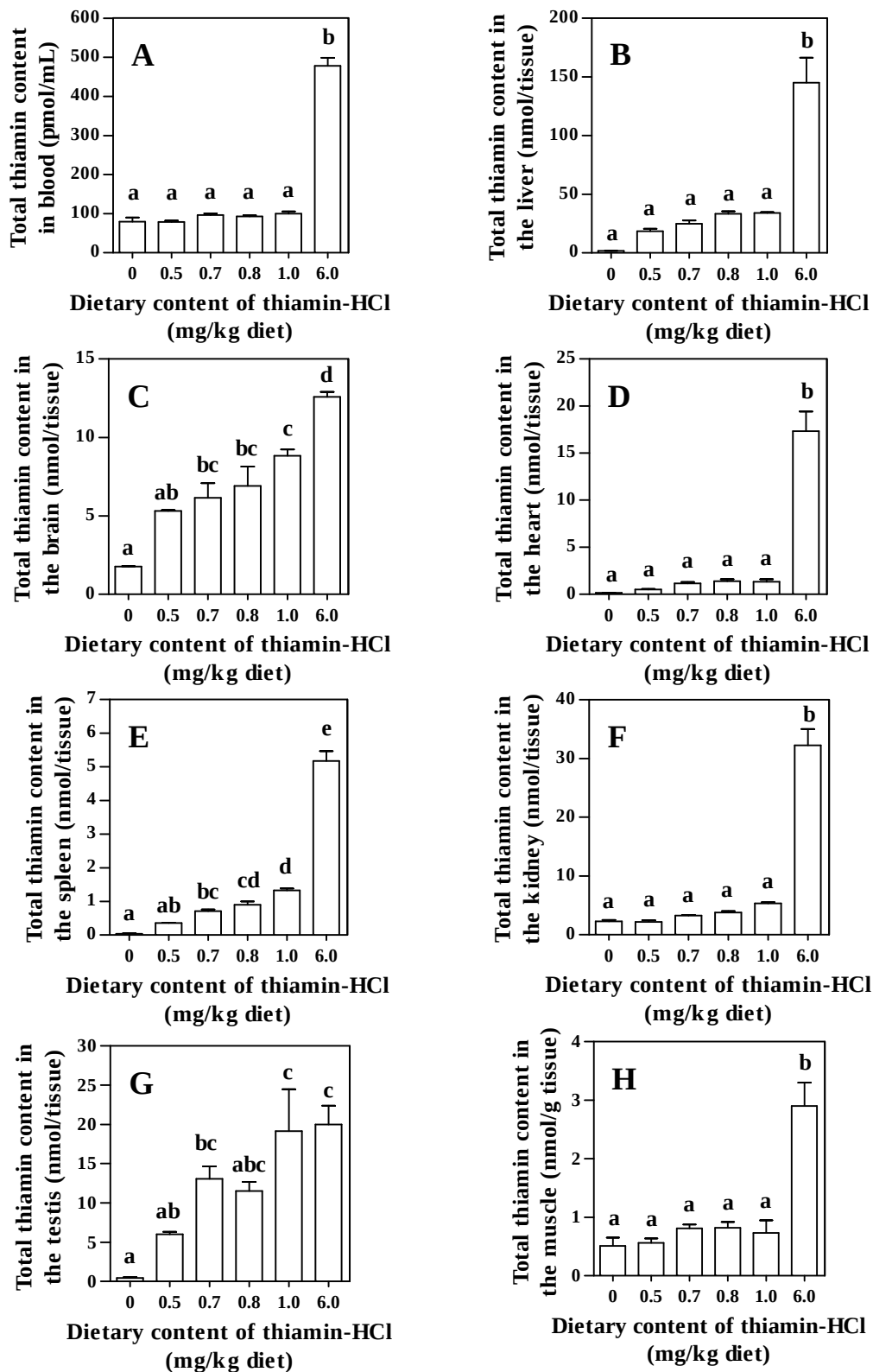


図 2. 飼料中のチアミン塩酸塩量が血中 (A), 肝臓 (B), 脳 (C), 心臓 (D), 脾臓 (E), 腎臓 (F), 精巣 (G), 大腿四頭筋 (H) の VB1 量におよぼす影響. 値は平均値±標準誤差 (n=4~6) として示した. 異なる添え字間で $p < 0.05$ の有意差があることを示す.