

# ビタミン欠乏動物の2・3の知見について

## — ビタミンB<sub>6</sub>欠乏 —

沖田美佐子 金行孝雄 黒田正清

### はじめに

ビタミンB<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>)は各種のアミノ酸代謝に関与しており、B<sub>6</sub>欠乏動物では、肝臓および血清のGOT、GPT活性が低下し<sup>(1-4)</sup>、血中の遊離アミノ酸のうち、スレオニンやグリシンが多いという報告がある。<sup>(5,6)</sup>また、B<sub>6</sub>欠乏と副腎皮質機能の関連については、種々の生化学的、組織学的研究<sup>(7)</sup>がなされているが、石原<sup>(8)</sup>はB<sub>6</sub>欠乏によって、初期には一過性の機能亢進を示し、以後は漸次低下すると報告している。B<sub>6</sub>欠乏ラットにおける尿中遊離アミノ酸排泄ならびに脳内遊離アミノ酸、グアニジノ化合物については、先に金行ら<sup>(9,10)</sup>が報告したが、今回はそれに引き続いて、B<sub>6</sub>欠乏ラットの尿中遊離アミノ酸排泄について更に検討を加えらるとともに、肝、血中のGOT、GPT活性及び副腎、血中コルチコステロン量ならびに副腎組織像について検索を行ったので報告する。

### 実験方法

#### 1. 実験動物

ウィスター系ラット(雄、体重約80g)を用い、6匹ずつ2群に分け、1群はB<sub>6</sub>欠乏飼料を与え、他の群はオリエンタル・ラット固型飼料を与えた。両群とも自由摂食、自由給水とし、35日間飼育した。

#### 2. ビタミンB<sub>6</sub>欠乏飼料

前報<sup>(9)</sup>と同じく、オリエンタル酵母工業株式会社製のものを使用した。

#### 3. 尿中遊離アミノ酸の分析

B<sub>6</sub>欠乏飼料で飼育しはじめてから34~35日目の尿を採取し、1%ピクリン酸で除蛋白を行ったのち、Dowex 1×8, cL型カラムで過剰のピクリン酸を除き、減圧濃縮後pH 2.2に調整したものをアミノ酸自動分析装置を用いて分析した。

#### 4. 血清および肝臓中のGOTとGPTの測定

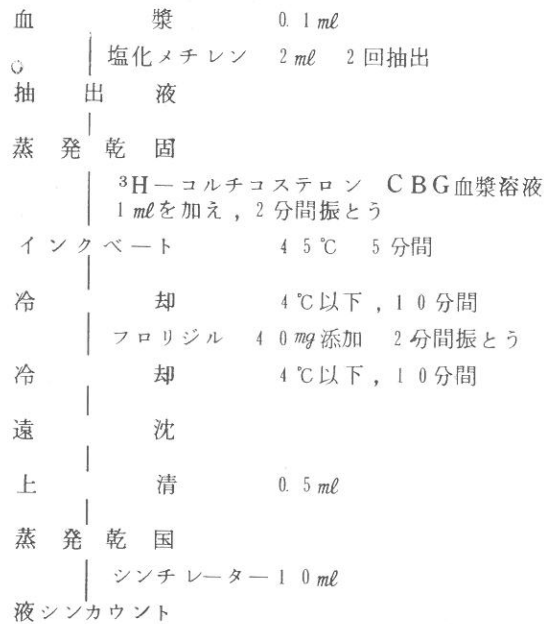
血清中のL-Aspartate : 2-Oxoglutarate aminotransferase (E.C. 2.6.1.1) (GOT)とL-Alanine : 2-Oxoglutarate aminotransferase (E.C. 2.6.1.2) (GPT)の酵素活性は日本消化器学会肝機能研究班による標準操作法(Reitman-Franke法<sup>(11)</sup>)を利用した和光純薬工業株式会社製の血清トランスアミナーゼ測定用キット(S.T.A. Test Wako)を使用した。

肝臓中のGOTとGPTの測定は、ラットを断頭し、すばやく肝臓を取り出し、0.1Mリン酸塩緩衝液(pH 8.2)を加え、ワーリングブレンダーでホモジナイズし、ホモジネートをさらにテフロン・ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、10%ホモジネートを作成して酵素液とした。酵素活性の測定は、S.T.A. Test Wakoを使用し、GOTあるいはGPT用基質液と10%肝ホモジネートをインクベートしたのち、6%過塩素酸により酵素反応を停止させるとともに除蛋白した。その上清を1N-NaOHでpH 7.5に合せた後、発色試薬を加え、室温に20分間放置後、0.4N-NaOH溶液を加えて混和し、比色定量した。空試験は基質のかわりに蒸留水を加えたほかは全く同様の操作を行った。

5. 副腎および血漿中コルチコステロンの測定

ラットを無麻酔下に断頭し、放出する血液を遠沈管にとった後、直ちに副腎を摘出し、脂肪組織を取り除き、左側の1個をコルチコステロン測定に用いた。血液は採血後ただちに遠沈し血漿を分離した。血漿中のコルチコステロンの測定は、Murphy<sup>(12)</sup>のRadiostereoassay法を一部改変して行った。測定方法は図1に示すとおりである。副腎はSilber<sup>(13)</sup>の方法に従って2 mlの33%エタノール中でホモジナイズし、蒸留水で10 mlとしたものを0.1 ml使用して血漿と同一の方法で測定した。

図1. コルチコステロイドのRadiostereoassay法



6. 副腎組織標本の作製

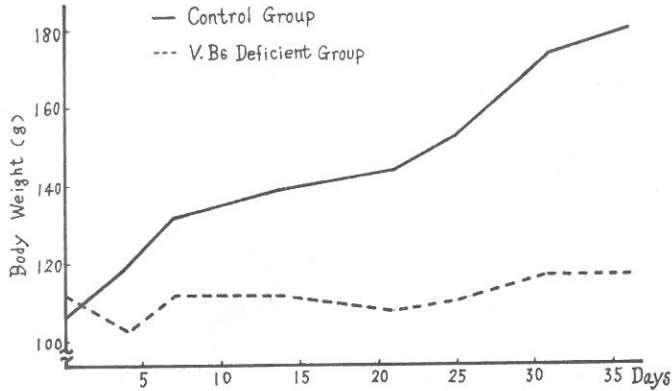
10%ホルマリンで固定したものを、ヘマトキシリン、エオシン染色ならびにズダンⅢ脂肪染色を行った。

# 実 験 結 果

## 1. 体重の変化

飼育期間中の体重変化は図2の如くである。

図2. 成長曲線



## 2. 尿中遊離アミノ酸排泄量

前報<sup>(9)</sup>でB<sub>6</sub>欠乏ラット尿中には、グリシン、アラニン排泄量の低下と、その他の遊離アミノ酸排泄量の著明な増加がみられることを報告した。今回の実験でもグリシン(対照群115.6μM/day, 欠乏群6.93μM/day), アラニン(対照群56.07μM/day, 欠乏群10.24μM/day)の低下を認めたが、その他のアミノ酸については、スレオニンが著明に増加(対照群0.07μM/day, 欠乏群0.58μM/day)したほかは著しい増加傾向を認めることができなかった。

## 3. 血清および肝臓中のGOT, GPT活性

表1は血清および肝臓中のGOT, GPT活性値であるが、B<sub>6</sub>欠乏群はいずれにおいても対照群に比較して低い値を示した。

## 4. 副腎および血漿中コルチコステロン

副腎および血漿中コルチコステロンの測定結果は表2の如くである。B<sub>6</sub>欠乏群は副腎、血漿いずれも対照群に比べてかなり高い値を示した。

表1. ラット血清及び肝のGOT, GPT活性

	血 清		肝	
	G O T	G P T	G O T	G P T
対 照 群	164, 121	56, 18	1, 20, 0	16, 18, 17, 19
V . B <sub>6</sub> 欠 乏 群	26, 32	0, 0	0, 0, 0	0, 0, 2, 12

(Karmen units)

表2. ラット副腎および血漿中コルチコステロン値

	副 腎	血 漿
対 照 群	0.53 μg/adr.	11.8 μg/dl
V . B <sub>6</sub> 欠 乏 群	1.02	18.9

## 5. 副腎皮質組織像

B<sub>6</sub>欠乏ラットの副腎皮質組織は、ヘマトキシリン・エオシン(H.E)染色したものについてみると、第一層では一部で構築が破壊され、出血がみられるが肥厚はみられない。第二層はやや

狭小となり、各細胞は小さくなり、細胞体の萎縮が認められる。核の変化はないが、その数は著るしく多くなり、第二層全体として細胞増殖像を示している。第三層の変化は最も大きく、内層細胞は密に押し合って細胞体の融合がみられ、網状構造は圧迫されて細い柵状に見られるところが多い。全体として充血があり、ところどころ出血している。また、一部は肥厚して第二層の中に立ち上り、第二層を圧迫している部分もみられる（写真1）。ズダンⅢ染色では、第一層の脂肪顆粒は多く、ところどころ大きく融合して塊状となっている。第二層では中等度の粗大顆粒が表層に近い部分から深層部まで束構造内部をみたし、一部では融合して大きなかたまりになっているところがある。第三層は脂肪顆粒は少ない（写真2、3）。

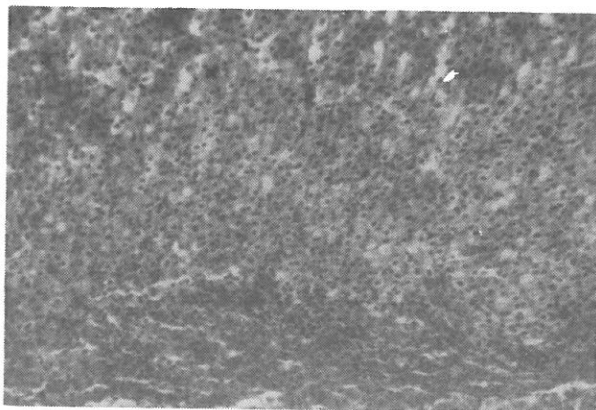


写真1  
H.E 染色

写真2  
ズダンⅢ染色

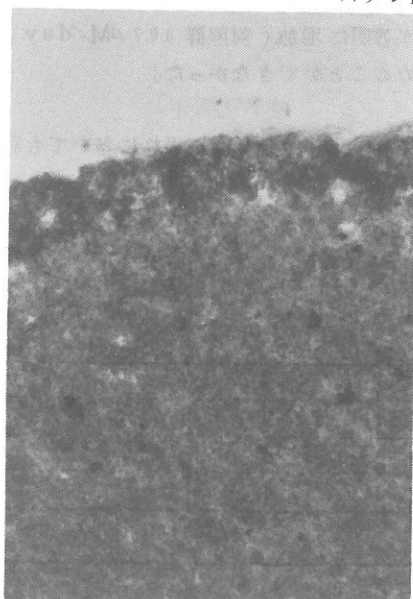
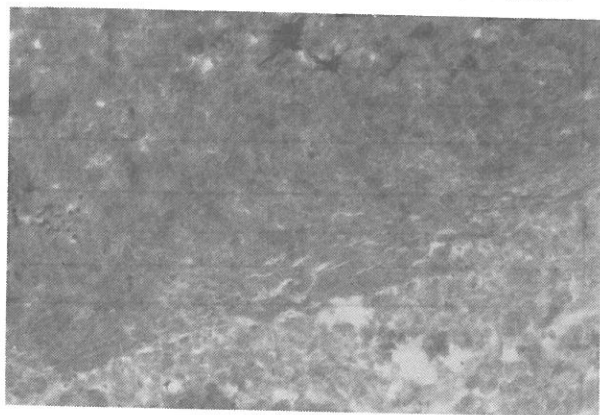


写真3  
ズダンⅢ染色



## 考 察

血中および肝臓中のGOT, GPTの活性低下はMeister<sup>(1)</sup>, Thiele<sup>(2)</sup>, 荒川<sup>(3)</sup>, 岡田ら<sup>(4)</sup>の報告と一致している。

尿中遊離アミノ酸排泄値をみると、欠乏群ではスレオニンが著しく高く、グリシン、アラニンが低い。小見ら<sup>(5)</sup>はラットの血中遊離アミノ酸に及ぼすB<sub>6</sub>欠乏の影響を食餌中の蛋白質量をかえて検討した結果、蛋白質6%群ではスレオニンとグリシン、18%群ではメチオニン、70%群ではグリシンが有意に増加したが、他のアミノ酸は減少したと報告、また、岡田ら<sup>(6)</sup>は、70%カゼイン食で飼育したB<sub>6</sub>欠乏ラットでは、尿、肝、血中いずれにおいてもスレオニンとグリシン値が高いと報告している。勝沼ら<sup>(14)</sup>による“B<sub>6</sub>欠乏の代謝異常に関する酵素学的研究”でも、B<sub>6</sub>酵素の動態は同じB<sub>6</sub>酵素でも臓器によって、またB<sub>6</sub>酵素の種類によって非常に多くの差異があることがわかり、その差異が代謝的なアンバランスをきたすことが示唆されている。本実験では、スレオニンの排泄量が多いが、哺乳動物ではスレオニン分解に対してのトランスアミナーゼの存在が知られないことやスレオニン脱水素酵素活性がB<sub>6</sub>欠乏時に低下する<sup>(5)</sup>ことから、B<sub>6</sub>欠乏時にはスレオニンの酵素的分解は非常に遅く、従って尿中排泄量が増加したのであろう。一方、アラニン、グリシンの排泄量は減少したが、B<sub>6</sub>欠乏餌による食欲不振も加わり、低栄養状態となって、これらアミノ酸の一部はエネルギー源として利用されたものかと思われる。

B<sub>6</sub>欠乏と副腎皮質機能について、石原<sup>(8)</sup>は、血中コルチコイド量よりみると、欠乏第2週までは亢進し、その後は次第に減退していくと述べている。私たちの結果では、欠乏第5週においてなお血漿、副腎中コルチコステロンは対照群より高値を示した。副腎皮質組織像は第三層の変化が著るしく、細胞核の増加、細胞索の増殖が目立った。第二層も第三層と同様で全体として分泌亢進を思わせる像が目立ち、ところどころ破壊像があり、機能減退を思わせる部分もあった。3層ともB<sub>6</sub>欠乏による代謝修復像と機能低下像が混在しており、この状態が更に続けば次第に破壊は進み、機能は衰え、血漿及び副腎中コルチコステロン量も減少していくのではないかと考えられる。脂肪顆粒の状態から考えれば、第一層のように顆粒の大きい部分は活動が低下しており、第三層の顆粒の小部分はむしろ活発に分泌作用が起っているところと見られる。第二層はその中間的な状態で、分泌は亢進から衰退に移るところのようである。これはACTHを投与したときに見られる脂肪顆粒の変化から推測されるもので<sup>(15)</sup>正常例(写真4)の第三層の示す脂肪像からも理解できる。

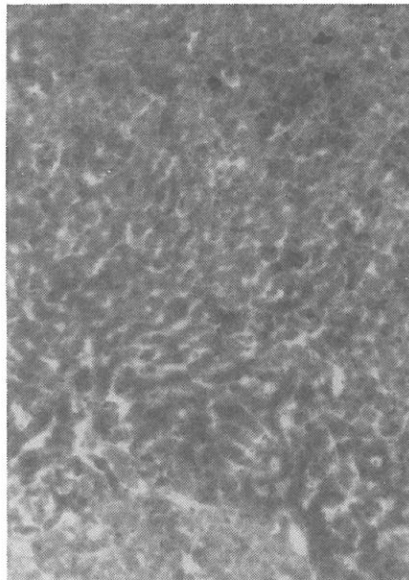


写真4  
ズダンⅢ染色

## 要 約

1. ウイスター系ラットをビタミンB<sub>6</sub> 欠乏飼料で35日間飼育し、B<sub>6</sub> 欠乏の肝、血中GOT、GPT、尿中遊離アミノ酸排泄および副腎皮質機能に及ぼす影響を検討した。
2. B<sub>6</sub> 欠乏ラットでは、肝、血中GOT、GPT活性は低下した。
3. 尿中遊離アミノ酸排泄はB<sub>6</sub> 欠乏群ではスレオニンが高く、アラニン、グリシンの値が低い。
4. 血漿、副腎中コルチコステロンはB<sub>6</sub> 欠乏群において高値を示した。
5. 副腎皮質組織像は第三層の変化が著しく、3層を通じて部分によっては機能亢進像を、ある部分では機能低下の像を示し、まず刺激増殖があり続いて破壊が起るものと考えられる。  
本研究の要旨は、第6回日本栄養・食糧学会、中四国支部大会において発表した。

## 文 献

- 1) Meister, A.; Soc. Exp. Biol. Med., 82, 391 (1953)
- 2) Thiele, V.F. and M. Brin; J. Nutr., 90, 347 (1966)
- 3) 荒川正巳; ビタミン, 36, 447 (1967)
- 4) 岡田美津子, 越智厚子; ビタミン, 43, 237 (1971)
- 5) 小見英代, 山田和子; 栄養と食糧, 26, 69 (1973)
- 6) 岡田美津子, 鈴木和彦; ビタミン, 47, 180 (1973)
- 7) 日本ビタミン学会編; ビタミン学の進歩 第4集, 丸善(昭和37年)
- 8) 石原紀臣; ビタミン, 18, 34 (1959)
- 9) 金行孝雄, 黒田正清; 岡山県立短期大学研究紀要, 15, 19 (1971)
- 10) 金行孝雄; 岡山県立短期大学研究紀要, 18, 21 (1974)
- 11) S. Reitman and S. Frankel; Am. J. Clin. Pathol., 28, 56 (1957)
- 12) B. P. Murphy; J. Clin. Endocr., 27, 973 (1967)
- 13) Silber, R.H., R.D. Busch and R. Oslapas; Clin. Chem., 4, 278 (1958)
- 14) 勝沼信彦; 蛋白質 核酸 酵素, 16, 239 (1971)
- 15) 高坂睦年, 沖田美佐子, 金行孝雄, 三好公明, 木本哲夫, 今井重之; ホと臨床, 21, 71 (1973)