

ビタミン B₆ 欠乏・高たん白質食投与による ラット脂肪肝発生におよぼす因子

鈴木和彦・岡田美津子*

緒 論

ビタミン B₆ (B₆) はアミノ酸代謝に密接に関連したビタミンであり、最近ではホルモンレセプターのモジュレーターとして^{1, 2)} 働くなどかなり広範囲の生理作用を有するものと考えられている。脂質代謝との関連では、Wakil 等の必須脂肪酸の炭素鎖延長に働く³⁾ とか、Braun⁴⁾ 等によるスフィンゴリピッド合成の脱炭酸過程に関与するという報告もある。B₆ 欠乏による脂肪肝は、Halliday⁵⁾ によりラットで最初に報告され、Rinehart⁶⁾ 等により Rhesus 猿で、また近年岡田⁷⁾ 等により 70% カゼイン B₆ 欠乏食をラットに投与して高頻度に脂肪肝の発現する事が報告された。この現象は、低たん白質食で生じやすいと一般に考えられている栄養性脂肪肝生成の概念を破るものである。またこれは B₆ と脂質代謝との関連や、アミノ酸代謝と脂質代謝との関係を追究するうえでも大いに役立つものと考えられる。著者らは、高たん白質・B₆ 欠乏食という実験条件で発生した脂肪肝の特性を明らかにする目的で、すでに種々の要因^{7, 8, 9)} について検討を加えてきたが、今回肝脂質の増加因子を中心に検討を加え、B₆ 欠乏時の脂肪肝発生が飼料中の微量因子の季節的およびロットによる含有量変動による影響ではなく、B₆ 欠乏の直接的または間接的影響により生ずると考えられる結果を得たので報告する。

実験方法

(1) 実験材料

初体重 50 g (3 週令) の雄ラットを、徳島実験動物研究所 (徳島) より Wistar 系 (W 系)、株式会社ケアリー (大阪) より Sprague-Dawley 系 (SD 系)、日本ラット株式会社 (浦和) より Donryu 系 (D 系) をそれぞれ購入し実験に使用した。最初の 2 ~ 3 日間は 20% カゼイン食で予備飼育を行い体重を 50 ~ 60 g に

した。その後 70% カゼイン (Table 1) に切り換え、すでに述べた^{10, 11)} ように、3 ~ 5 週間 ad lib または paired feeding にて飼育した。なお SD 系と D 系は系統差の影響をみる実験のみに使用し、他の実験ではすべて W 系を使用した。DL-Methionine (GR), Squalene (GR), Cholesterol (GR) は半井化学。L-Threonine (GR) は日本理化学薬品。Retinol palmitate, Ergocalciferol はエーザイ株式会社。ビタミン・フリーカゼインは、Nutritional Biochemicals Corporation (NBC, Cleveland Ohio)。塩混合、ビタミン混合はオリエンタル酵母。肝油は鳥居薬品。大豆油は林純薬工業よりそれぞれ購入した。その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

Table 1. The composition of diet

	B ₆ (-)	B ₆ (+)
		(%)
Vitamin free casein	70	70
Sucrose	17	17
Oil mixture ^{a)}	8	8
Salt mixture ^{b)}	4	4
Vitamin mixture ^{b)}	-	1
VB ₆ free vitamin mixture ^{b)}	1	-
Choline chloride	0.2	0.2

a). Cod liver oil-soy bean oil (1 : 4).

b). Salt mixture and vitamin mixture based on Rogers-Harper were purchased from Oriental Kobo Co.

(2) 測定方法

脂質の抽出は、Folch¹²⁾ らの方法に従い重量法にて脂質量を測定した。血清コレステロール、飼料中コレステロール、ビタミン・フリーカゼイン中コレステロールは、Zak-Henly の変法にて測定¹³⁾ した。

* 鳴門教育大学

〔実験方法〕

1) 実験1: ラット系統差の影響

SD系, D系, W系(各群6匹)のラットに4~5週間 ad lib にて実験食を与え系統差による肝脂質量および, 血清コレステロールへの影響をみた。

2) 実験2: 肝油中の微量成分添加の影響

70%カゼイン食に, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%のSqualene, 0.1, 0.2%のCholesterol, Retinol palmitate 90 IU/g, Ergocalciferol 12 IU/gをそれぞれ添加し ad lib にて3~4週間飼育後(各群6~7匹), 肝脂質量と血清コレステロールへの影響をみた。

3) 実験3: アミノ酸添加の影響

70%カゼイン食に1%メチオニンまたは2%スレオニンをそれぞれ添加し ad lib にて3~4週間飼育後(各群6匹)肝脂質量への影響をみた。

4) 実験4: 抽出カゼインの影響

1) ビタミン・フリーカゼインを8時間以上エタノール・0.1%塩酸で, 還流により温抽出を行い50℃でエタノールを除去した¹⁴⁾後, 実験食として使用した。抽出カゼインを用いた70%カゼイン食で5週間, 欠乏群(6匹)は ad lib にて飼育後, 肝脂質量ならびに血清コレステロールを測定した。

2) 食事摂取量を制限した場合の影響をみるために実験食投与を開始した後, 実験4の1)で飼育したラット摂食量の80%をB₆欠乏制限食群①(5匹)と, B₆補足制限食群②(5匹)に与え3週間飼育後, ①は ad lib とし, ②は①の paired feedingで, 2週間更に飼育し肝脂質量を測定した。なお実験1~4に用いた全ての動物は15時間飢餓の後, 断頭屠殺し実験に供した。

実験結果

実験1: ラット系統差の影響

実験動物の系統による差の有無を調べるために, S-D系, D系, W系の3系統を実験食で飼育し, その影響を調べた。成長率は欠乏群, 補足群ともD系がもっともよく, 次にW系, SD系という順であった。血清コレステロール(Table 3)への影響は, W系で有意な低下を認めたが, SD系ならびにD系では差を認めなかった。肝脂質量はD系で, 欠乏群, 補足群とも, もっとも高値を示したが3系統間ではほとんど差がみられず以後の実験にはW系を用いた。

実験2: 肝油中に含まれる微量成分の影響

Table 1に示すように, ビタミンA(VA)ならびにビタミンD(VD)の供給源として著者らは, 以前

よりたら肝油を使用している。たら肝油中には, 0.5~2%の不けん化物が含まれ¹⁵⁾, これらの濃度の差による影響をみる必要がある¹⁶⁾。最初に0.1, 0.2, 0.3, 0.4%のスクワレンを飼料中に添加し肝脂質量ならびに, 血清コレステロールにおよぼす影響をみた。Table 3に示すようにB₆欠乏動物の肝脂質量はスクワレン添加によりコントロール群に比べ有意な増加または増加の傾向を示した。しかしスクワレンの添加量の増加に伴う肝脂質の上昇は認められなかった。またB₆補足群でも, W系対照(無添加)群のそれに比べスクワレン添加による肝脂質量の上昇する傾向がみられた。血清コレステロールは, B₆欠乏群で低下の傾向または有意な低下を示した。

現在使用している70%カゼイン食100g中にはほぼ260mgのコレステロールが含まれている(Table 2)。

Table 2. The content of cholesterol and cholesterol ester in vitamin free casein and 70% casein pyridoxine deficient diet.

	Cholesterol	Cholesterol* ester
		(mg/100 g)
Vitamin free casein	9.2	5.1
70% casein pyridoxine deficient diet	103.8	155.9

* Cholesterol ester content is expressed as mg of cholesterol.

無菌動物に少量のコレステロールを飼料中に添加すると, 肝に多量のコレステロールの蓄積する事が報告¹⁷⁾されている。そこで少量のコレステロールを飼料中に添加しその肝脂質量への影響をみた(Table 3)。肝脂質量はコレステロールの添加量の増加に伴い欠乏, 補足の両群において同様に上昇した。血清コレステロールに欠乏群で低下の傾向を示した。

Misra¹⁸⁾はretinol過剰投与によりトリグリセライド, コレステロール, コレステロールエテルの増量を伴う脂肪肝の発生する事を報告している。B₆欠乏のように栄養のアンバランスの状態では, VAまたはVDの添加量が多少過剰でも肝脂質量に対し鋭敏に影響することも考えられる。そこでVAを通常量の3倍, VDを4倍量それぞれ添加し, 肝脂質量ならびに血清コレステロールへの影響をみた(Table 3)。成長はVAまたはVDの添加による影響をほとんどうけないが, 肝脂質量を, みると無添加群(対照群)に比べ, ビタミン過剰群ではB₆欠乏群・補足群とも増量を示した。

特にVD過剰のB₆欠乏群では著しい増量がみられた。しかしVAまたはVD過剰のB₆欠乏群、補足群の両者には有意な差はみられず、血清コレステロールにも両群でほとんど差がみられなかった。

実験3：アミノ酸添加の影響

高たん白質で飼育すると、アミノ酸代謝に関連をもつB₆の消費量が増し早期にB₆欠乏になると考えられている^{19,20)}。B₆欠乏の程度をさらに高める²¹⁾ために、まずDL-メチオニンを1%になるように実験食に加え肝脂質量への影響をみたメチオニン添加によりB₆補足群も欠乏群も成長率は低下し、高たん白食によるメチオニンの成長低下作用の緩和は認められなかった。肝脂質量への影響は、Table 3に示したようにB₆欠乏群では補足群に比べ有意な増量を示した。既報^{10,11)}の通り、スレオニンはセリンと同様B₆欠乏動物で、とくに高い肝脂質量を示す群で血液中ならびに肝で高濃度を示すアミノ酸である。そこでこの実験食に含まれる約2倍量のスレオニン(2%)を添加し飼育し、肝脂質量への影響をみた(Table 3)。スレオニンは一般に害作用の少ないアミノ酸²²⁾といわれているが、成長率の低下はB₆欠乏群、補足群においてもみられ

ず、高たん白食においても悪影響と思われる所見はみられなかった。肝脂質量への影響については、B₆欠乏・スレオニン添加群ではスレオニン添加の対照群に比べ有意な低下を示した。またメチオニン添加のB₆欠乏群と比較しても有意な低下を示した。

実験4：抽出ビタミン・フリーカゼインおよび20%摂食量制限の影響

B₆はTable 1の飼料成分の中では、微量ではあるがビタミン・フリーカゼイン中に、もっとも多く含まれる。その微量のB₆をさらに抽出するため、既述のようなエタノール・塩酸で抽出し、エタノールを除去した後、飼料として用いた。この方法により8時間抽出した抽出液の色は黄色調を示し、かなりの残存B₆が抽出されたものと思われる。

Table 3に示すように、肝脂質量への影響をみるとB₆欠乏群では、8.3%と著しい脂肪量の増加を示した。しかし対照群ではほとんどその影響はみられなかった。さらに摂食量を80%に制限して3週間飼育し、後半2週間を自由摂食にした場合にもB₆欠乏群の肝脂質量の増加が一層強くみられた。これらの結果はB₆摂取を減らす事の有効性を示すものと思われる。

Table 3. The effects of strain differences and dietary additions on liver lipid and serum cholesterol concentrations in rats fed a diet with or without pyridoxine.

Experiment NO.	Dietary additions	B ₆ (-)		B ₆ (+)	
		Liver lipid ^{a)}	Serum [C] ^{b)}	Liver lipid ^{a)}	Serum [C] ^{b)}
1. Strain difference					
Sprague-Dawley	(-)	56.0±11.1	60.8±18.4	44.6±4.5	78.1±12.0
Donryu	(-)	68.4±18.2	77.3±8.6	51.3±4.2	67.3±8.0
Wistar	(-)	55.9±16.3	77.2±11.5*	41.6±2.1	102.2±14.3
2. 1) Squalene					
	0.1%	73.0±19.5*	79.5±21.3	47.5±4.2	92.9±8.7
	0.2%	76.3±26.2*	87.3±14.1	48.1±6.3	91.7±12.0
	0.3%	61.6±26.0	65.4±22.5*	46.1±8.6	94.1±15.4
	0.4%	73.3±22.3*	74.9±29.7	49.6±4.6	94.8±11.0
2) Cholesterol					
	0.1%	65.2±17.3	80.9±30.9	62.0±5.3	105.6±27.3
	0.2%	72.2±17.3	84.5±12.9	75.4±7.4	99.9±15.4
3) Retinol palmitate					
	(90 IU/g)	56.4±21.9	79.7±15.4	59.8±3.9	80.8±9.2
Ergocalciferol	(12 IU/g)	82.7±32.3	81.4±20.9	66.2±6.3	87.5±4.7
3. DL-Methionine					
	1%	60.5±13.8*	-	44.7±3.6	-
L-Threonine	2%	42.1±5.2*	-	53.1±3.1	-
4. Washed casein					
	(-)	83.2±38.8*	85.0±25.5	37.0±5.0	97.4±11.8
Food restriction	(-)	95.7±41.8*	-	39.4±2.2	-

a). Liver lipid concentration is expressed as mg/g wet weight.

b). Serum [C] : Serum cholesterol concentration is expressed as mg/dl serum. The values are means ± S. D. The asterisk indicates where increase or decrease in response to pyridoxine-deficient diet is significant ($p < 0.05$). The experiments of 2, 3 and 4 were performed with Wistar strain rats.

考 察

B₆欠乏による脂肪肝は、他の栄養性脂肪肝と異なり^{23,24,25)}、高たん白質食により発生しやすく、その程度も強いことはすでに述べて^{7,8)}きた。B₆欠乏70%カゼイン食により発生する脂肪肝がB₆欠乏そのものによる影響か、または餌中に含まれる微量成分によるものかを確かめるため、まず飼料・肝油中に含まれる不けん化物添加の影響についてみた。これらの物質は確かにB₆欠乏動物の肝脂質量を増加させたが、B₆補足対照群にも有意な増加あるいは、増加の傾向を示した。したがって、B₆欠乏による脂肪肝の原因物質がこれらの不けん化物である可能性は少ないものと考えられる。

次にB₆欠乏の影響についてみると、B₆は非常に微量でその必要量を満たすと考えられている²⁶⁾ので、B₆の欠乏実験を行うに際しては、飼料へのB₆の混入を最善をつくして防ぐ必要がある。そこでここで示したようにB₆の欠乏度をさらに高める²¹⁾と考えられるアミノ酸の添加を行ったが、予想に反し肝脂質量には大きな影響を与えなかった。ビタミン・フリーカゼインはgあたり0.63μgのピリドキシンが含まれているというNBCのデータがあるが、すでに述べたようにB₆欠乏70%カゼイン食では、飼料中のビタミン・フリーカゼインからもっとも多量にB₆が供給される。NBCでは、温・メタノールによりカゼイン中に含まれるビタミンを抽出するという方法がとられているが、著者の実験ではこのビタミン・フリーカゼインを更に塩酸・エタノール抽出法により精製して使用した。その結果B₆欠乏食による脂肪肝は、B₆欠乏そのもの影響によることが確かめられ、肝油その他に含まれる微量成分により生ずる脂肪肝での肝脂質量に影響を与える要因の1つは、ビタミン・フリーカゼイン中に残存する微量のB₆の差異と考えられる。これらの結果よりB₆欠乏による脂肪肝は、他の栄養性脂肪肝と異なり、高たん白質食投与時に増強され、栄養性脂肪肝としては特異的な位置にあるものと考えられる。

要 約

B₆欠乏70%カゼイン食による脂肪肝の発生にあたる因子について検討を加えた。ラット系統差(Wistar, Sprague-DawleyとDonryuの3系)の有無についてみると、Donryu系で、肝脂質量の平均値がもっとも高かった。しかし対照群の肝脂質量と欠乏群との比率をみると、3系統間に差はみられなかった。次に飼料中に含まれる微量成分が脂肪肝の原因物質である可能性

について確かめるため、飼料にスクワレン、コレステロール、レチノール、エルゴカルシフェロールをそれぞれ添加し、肝脂質量、血清コレステロールにあたえる影響を調べた。これらの不けん化物はB₆欠乏動物だけでなく、対照群にも、肝脂質量の増加または、増加の傾向をもたらした。1%メチオニンの添加により、肝脂質は軽度の増加を示した。B₆欠乏時の肝および血清中に増加するスレオニンの添加(2%)では、対照群にくらべ低下を示した。欠乏飼料中B₆をもっとも多く含有するビタミン・フリーカゼインについてさらに、0.1%塩酸・エタノールで抽出・精製し飼料に用いると、B₆欠乏動物の肝脂質量の著しい増量を認めた。これらの結果より、B₆欠乏により生ずる脂肪肝は飼料中に含まれる不けん化物の影響と考えるよりも、B₆欠乏の直接的あるいは間接的影響によるものと考察された。

Summary

Factors affecting liver lipid content after feeding on 70% casein pyridoxine-deficient diet were studied. The mean values of liver lipid content were maximum in Donryu strain, but the ratio of liver lipid content in pyridoxine-deficient rats to that of control was similar among three strains tested (Wistar, Sprague-Dawley and Donryu strains). To determine whether or not any dietary factors other than pyridoxine-deficiency were responsible for fatty liver induction, we examined the effects of added squalene, cholesterol, retinol palmitate and ergocalciferol to the experimental diets on liver lipid content and serum cholesterol concentration. The addition of such unsaponifiable matters induced elevations of liver lipid content both in pyridoxine-deficient and in the control groups. The addition of 1% of methionine to a pyridoxine-deficient diet caused moderately fatty accumulation. Two % threonine added to the deficient diet caused a decrease in liver lipid content. The rats fed on vitamin free casein extracted with acidic alcohol showed an increase in liver lipid content in pyridoxine-deficient rats, but no increase was observed in the pair fed control. These findings indicated that induction of fatty liver in the pyridoxine-deficient rat was not due to the unsaponifiable matters contained in the experimental diet but pyridoxine-

deficiency per se.

を賜りました徳島大学医学部岸野泰雄教授に深謝致し

本研究を行うにあたり終始有益なるご助言、ご指導 ます。

References

- 1) Cidlowski, J. A., and Thanassi, J. W. : Pyridoxal phosphate induced alterations in glucocorticoid receptor conformation. *Biochemistry*, 18, 2378, (1979).
- 2) Muller, R. E., Traish, A., and Wotiz, H. H. : Effect of pyridoxal 5'-phosphate on uterine estrogen receptor. II Inhibition of estrogen receptor transformation. *J. Biol. Chem.*, 255, 4062, (1980).
- 3) Wakil, S. : Mechanism of fatty acid synthesis. *J. Lipid Res.*, 2, 1, (1961).
- 4) Braun, P. E., and Snell, E. E. : The biosynthesis of dihydrosphingosine in cell-free preparations of *hansenula ciferri*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58, 298, (1967).
- 5) Halliday, N. : Fatty liver in vitamin B₆ deficient rats. *J. Nutr.*, 16, 285, (1938).
- 6) Rinehart, J. F., and Greenberg, L. D. : Vitamin B₆ deficiency in the Rhesus monkey with particular reference to the occurrence of atherosclerosis, dental caries and hepatic cirrhosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 4, 318, (1956).
- 7) Okada, M., and Ochi, A. : The effect of dietary protein level on transaminase activities and fat deposition in vitamin B₆ deficient rat liver. *J. Biochem.*, 70, 581, (1971).
- 8) Suzuki, K., Nakamura, T., Fujita, M., Iwami, T., Abe, M., and Okada, M. : Factors affecting liver lipid content in pyridoxine-deficient rats. I. Dietary protein levels. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 22, 291, (1976).
- 9) Suzuki, K., and Okada M. : Role of glucose on fatty liver formation in pyridoxine-deficient rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 28, 367, (1982).
- 10) Okada, M., and Suzuki, K. : Amino acid metabolism in rats fed a high protein diet without pyridoxine. *J. Nutr.*, 104, 287, (1974).
- 11) 岡田美津子, 鈴木和彦, 三木博美, 広瀬美千代, 鳥越一代 : ビタミンB₆ 欠乏動物の脂肪肝の発現と肝遊離アミノ酸組成との関連について. *ビタミン*, 51, 407, (1977).
- 12) Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497, (1957).
- 13) Zak, B. : Simple rapid microtechnique for serum total cholesterol. *J. Clin. Path.*, 27, 583, (1957).
- 14) Muto, Y., Smith, J. E., Milch, P. O., and Goodman, D. S. : Regulation of retinol-binding protein metabolism by vitamin A status in the rat. *J. Biol. Chem.*, 247, 2542, (1972).
- 15) 桜井芳人, 齊藤道雄, 東秀秀雄編 : 「食品工業」, 恒星社厚生閣, p 554, (1965).
- 16) Greenfield, H., and Briggs, G. M. : Nutritional methodology in metabolic reserch with rats. *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 549, (1971).
- 17) Gustafsson, B. E., Finarsson, K., and Gustafsson, J. A. : Influence of cholesterol feeding on liver microsomal metabolism of steroids and bile acids in conventional and germ-free rats. *J. Biol. Chem.*, 250, 8496, (1975).
- 18) Misra, U. K., : Liver lipid of rats administered excessive amont of retinol. *Can. J. Biochem.*, 46, 697, (1968).
- 19) Itoh, R., and Okada, M. : Effect of dietary protein level on pyridoxal content in tissues and excretion of pyridoxic acid into urine in normal or pyridoxine-deficient rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 19, 523, (1973).
- 20) Linkswiler, H. : Biochemical and physiological changes in vitamin B₆ deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, 20, 547, (1967).
- 21) Harper, A. E., Benevenga, N. J., and Wohlhueter, R. M. : Effects of ingestion of disproportionate

- amounts of amino acids. *Physiol. Rev.*, 50, 428, (1970).
- 22) Sauberlich, H. E. : Studies on the toxicity and antagonism of amino acids for weanling rats. *J. Nutr.*, 75, 61, (1961).
- 23) Aoyama, Y., Yasui, H., and Ashida, K. : Effect of dietary protein and amino acids in a choline-deficient diet on lipid accumulation in rat liver. *J. Nutr.*, 101, 739, (1971).
- 24) Hassan, A. S., and Milner, J. A. : Orotic acid biosynthesis arginine-deficient rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 194, 24, (1979).
- 25) Harper, A. E. : Nutritional fatty liver in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 6, 242, (1958).
- 26) Beaton, G. H., and Cheney M. C. : Vitamin B₆ requirement of the male albino rat. *J. Nutr.*, 87, 125, (1965).

昭和63年1月26日受理