

ビタミン B₆ 欠乏による脂肪肝とその増加因子の検索

鈴木和彦・岡田美津子*

緒 論

著者らは高カゼイン(70%)ビタミン B₆ (B₆) 欠乏食により、アミノ酸の代謝異常及び脂肪肝の生ずる事を報告した。^{1,2)} 著者らはこれまでに B₆ 欠乏脂肪肝の生成機構^{3,4)} 及び肝臓トリグリセライド(TG)の起源⁵⁾ について報告してきた。しかしこの脂肪肝を引き起こすと考えられる肝脂肪の増加因子に関してはほとんど報告はない。アルギニン(Arg)欠乏食による脂肪肝はオロチン酸(OA)が過剰合成され、OAがその増加因子と考えられている。^{6,7)} ところが多くの栄養性脂肪肝の原因物質はいまだ明らかでない。上田ら⁸⁾ は B₆ 欠乏ラットの血清オルニチントランスカルバミラーゼ(EC 2.1.3.3; OTC)活性が上昇する事を報告している。そこで本報告では、肝 OTC 活性が血清 OTC 活性とは逆に低下し、OA の過剰合成が起こりその結果、B₆ 欠乏による脂肪肝が生ずる可能性をみる目的で肝および血清 OTC 活性、ならびに尿中 OA 量について測定を行った。

実験方法

(1) 実験材料

①動物 動物は Wistar 系雄で初体重 50 g, 3 週齢のラットをこれまでの報告^{3,4)} と同様にコントロール群として Pair-fed 群(P 群)をとり約 5 週間飼育し実験に使用した。

②試薬 L-Ornithine, p-Dimethyl aminobenzaldehyde は半井化学, Diacetylmonooxime, Cetyltrimethylammonium bromide(CTB), Urease, L-Carbamyl phosphate, L-Citrulline, は和光純薬。臭素水は林純薬, Phenazone は Sigma 社より入手した。餌に用いたビタミンフリーカゼインは NBC (Nutritional Biochemicals Corporation), 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。

(2) 測定方法

脂質の抽出は, Folch⁹⁾ らの方法に従い重量法にて脂質量を測定した。肝及び血清 OTC 活性は, Brown と Cohen の方法¹⁰⁾ に従い, Urease で尿素を分解し, その上清を酵素液として用いた。反応液は Ornithine (0.2M), Carbamyl-phosphate(0.05M), 0.2M Triethanolamine buffer(pH8.0) を用いた。反応後生成した Citrulline は Prescott と Jones¹¹⁾ の方法により測定した。尿中の OA は Stajiner¹²⁾ 等の方法により測定を行った。

1) 実験 1 実験 1 は 36 匹の B₆ 欠乏動物と 25 匹の P-群を使用した。それぞれの実験群に B₆ 欠乏食と B₆ 補足食を与え, 約 5 週間飼育後, 肝脂質と副睪丸脂肪組織の脂肪量を測定した。

2) 実験 2 実験 2 は実験 1 と同様の条件で動物を飼育した。ラットは欠乏群 11 匹, B₆ 補足群で 8 匹を使用し, 肝および血清 OTC 活性, 肝脂質および尿中 OA 量を測定した。

実験結果

実験 1 Table 1 に示すように B₆ 欠乏時に生ずる脂肪肝は摂食量や終体重とは相関はなく肝重量のみと有意な正の相関がみられた。従って動物の肝脂質量を外見から推定する事は難しい。次に体脂肪の流入増加がこの脂肪肝の原因である可能性をみるために肝脂質(mg liver lipid/g liver)ならびに総肝脂質(mg total liver lipid/100g body weight)と副睪丸脂肪組織の総脂肪量との相関をみたが, 有意な負の相関はみられなかった。従って脂肪組織からの脂肪酸の流入増加のために脂肪肝の生ずる可能性は少ないものと考えられる。そこで体全体の脂質のホメオステシスをみるために副睪丸脂肪組織総脂質量と肝総脂質量を体重 100 g あたりで表し, その相対度数をみた。Fig.1 に見られるように, 肝脂質量は P 群においては, 体重 100 g あたりすべての個体において 100 ~ 200 mg と一定した値をと

* 鳴門教育大学

ビタミンB₆欠乏による脂肪肝とその増加因子の検索

Table 1. Correlation coefficients among liver lipid, relative liver weight, epididymal adipose lipid, food intake and final body weight in pyridoxine-deficient rat.

	Liver lipid (mg/g liver)	Relative liver weight (%)	Adipose lipid (mg)	Food intake (g)	Final body weight (g)
Liver lipid					
Relative liver weight	0.719*				
Adipose lipid	0.105	0.084			
Food intake	0.270	0.161	0.681*		
Final body weight	-0.065	0.028	0.718*	0.683*	

N=36. * statistically significant ($p < 0.05$).

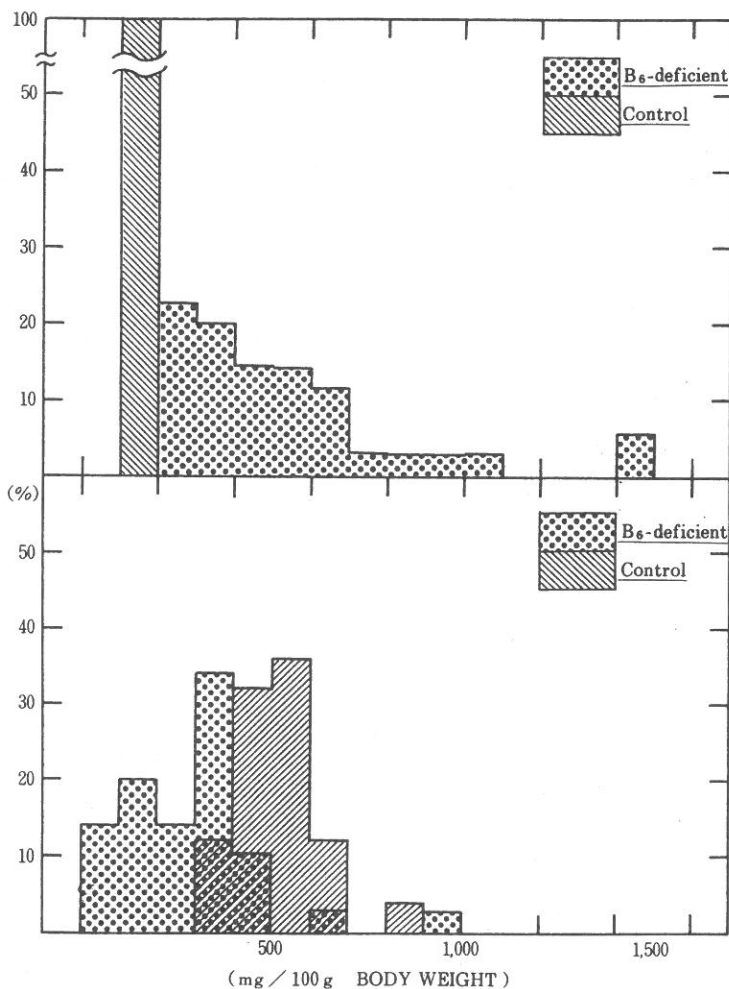


Fig. 1. Distribution chart of total liver (above) and epididymal adipose tissue (below) lipids/100g body weight.

る。ところがB₆欠乏動物では、200～1,500 mgとかなり広範囲のばらつきをみせる。しかしコントロール群の値に近い個体ももっとも多く順次、肝脂肪量が高くなるに従い、その頻度は低くなった。副睪丸脂肪総脂質量は、摂食量と正の相関があり、P群は500 mgにその最頻値がありほぼ正規分布をする。B₆欠乏動物では300 mgにその最頻値があり、平均値にくらべきわめて脂質量の高い個体や低い個体も多く存在する。これらの結果はコントロール群では、食餌量にかかわらず、脂肪組織の脂質量を変化させ肝脂質量を一定にしているものと考えられる。一方B₆欠乏動物では肝脂質量がコントロール群に近い個体が最も多いので、肝脂質量を一定にしようとする機能は、B₆欠乏により生ずる何らかの物質あるいはB₆欠乏の直接的作用のため完全に欠如するのではなく一部低下しているものと考えられる。

実験2. 実験2では、B₆欠乏動物は血清OTC活性とは逆に肝OTC活性が低下し、その結果

OA合成が増加する可能性についてみた。血清OTC活性はB₆欠乏動物群では高い傾向を示すが、B₆欠乏動物で8%以上の肝脂質量を示す群と8%以下の肝脂質量を示す群においては血清OTC活性には差は認められなかった(Table 2)。肝OTC活性はB₆欠乏群で比活性はコントロール群にくらべ有意に低下するが、総活性ではコントロール群とほとんど差は認められなかった。B₆欠乏動物で8%以上の肝脂質量を示す群と

8%以下の肝脂質量を示す群においても肝OTC活性には差は認められなかった(Table 3)。次に尿中の一日あたりのOA排泄量を測定した(Table 4)。B₆欠乏群ではコントロール群にくらべOA排泄量は有意に高い値を示した。しかしB₆欠乏動物で8%以上の肝脂質量を示す群と8%以下の肝脂質量を示す群においても尿中OA排泄量には差は認められなかった。

Table 2. Effect of pyridoxine-deficiency on serum ornithine transcarbamylase activity.

	Liver lipid	Specific activity
	(%)	(μ mole citr. / 100 ml serum / min)
Pyridoxine-deficiency	> 8	2.14 \pm 0.85 (5)
	< 8	2.40 \pm 1.69 (6)
Pair-fed control	4	1.31 \pm 0.93 (8)

Values are means \pm SD for samples determined in duplicate. Numbers in parentheses are numbers of rats.

Table 3. Effect of pyridoxine-deficiency on liver ornithine transcarbamylase activity.

	Lipid (%)	Specific activity	Total activity
		(μ mole citr. / mg prot. / min.)	(μ mole citr. / min. / 100 g B.W.)
Pyridoxine-deficiency	> 8	0.0538 \pm 0.0200 *	0.250 \pm 0.092 (5)
	< 8	0.0531 \pm 0.0223	0.219 \pm 0.095 (6)
Pair-fed control	4	0.0840 \pm 0.0260	0.259 \pm 0.117 (8)

Values are mean \pm SD for samples determined in duplicate. Numbers in parentheses are numbers of rats.

* statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 4. Effect of pyridoxine-deficiency on urinary excretion of orotic acid.

	Liver lipid	Urinary excretion of orotic acid
	(%)	(μ g / day / 100 g B.W.)
Pyridoxine-deficiency	> 8	1.78 \pm 1.27* (5)
	< 8	2.08 \pm 1.10* (6)
Pair-fed control	4	0.59 \pm 0.26 (8)

Values are mean \pm SD. Numbers in parentheses are numbers of rats. * statistically significant difference ($p < 0.05$).

考 察

B₆欠乏による脂肪肝は他の栄養性脂肪肝と異なり、高たん白食により発現しやすく、その程度も強くなる事はすでに述べた。¹³⁾これは高たん白食によりB₆の消費量が増加し、^{14, 15)}B₆欠乏の程度が高くなるためと考えられる。従ってB₆が脂質代謝系あるいは内分泌系に直接関与して脂肪肝が生じているのか、脂肪肝を引き起こす代謝産物が餌中のたん白質レベルが上昇

するに従い増加し、脂肪肝が発生しているのかはいまだ明らかでない。この報告(Fig. 1)でもみられるように、B₆欠乏の脂肪肝は何かある強力な脂質の増加因子が肝脂質を一定にする機構をまったく欠如させるような機構ではなく、おそらくB₆欠乏の程度の差や、アミノ酸代謝産物の量の違いが肝脂質ホメオスタシスのバランスを一部変動させているものと考えられる。これまでの研究を考えるとB₆欠乏による脂肪肝はB₆

欠乏の度合に依存しているものと考えられる。この点についてはすでに報告しているように肝GPT(glutamic pyruvic transaminase; EC 2. 6. 1. 2) 活性と肝脂質量が負の相関¹³⁾をもつ事や、餌に使用するビタミンフリーカゼインをさらにアルコールで洗浄・抽出する事¹⁶⁾により肝脂質が増加するという点などにより明らかと思われる。また雌の肝B₆量は雄に比べ高い¹⁷⁾という報告があり、B₆欠乏の脂肪肝が他の脂肪肝の成因と異なり雌で脂肪肝¹⁸⁾が起りにくいという事とも関連があるものと考えられる。肝OTCはB₆を補酵素とする酵素ではないが、肝疾患時に血清に遊出すると考えられている¹⁹⁾。上田等⁸⁾の報告のように血清OTC活性はB₆欠乏動物で上昇の傾向はみられる。肝OTC活性は比活性においてB₆欠乏群で低下を示す(Table 3)。肝OTC活性の低下に基づく、OAの過剰合成の可能性をみるために、尿中OA量を測定すると、B₆欠乏群の尿中OA量はP群のそれにくらべ有意な増加を示した。しかしB₆欠乏動物では肝脂質量が8%以下の群でも8%以上の群と同程度のOAを排泄している。その量はArg欠乏食投与時にみられた尿中OA量の1/15程度と低く、OAがこの脂肪肝の原因物質と考えることはやや困難な結果と思われる。

以上の結果よりB₆欠乏時の脂肪肝の原因物質が強力な脂肝因子であるOAであるとは考え難い。従ってB₆欠乏ラットでOAなど種々の増加因子が相加的に働く可能性が高いものと思われる。以前、著者⁴⁾ら、また最近Looら²⁰⁾はB₆欠乏ラット肝 phosphatidyl choline (PC) 量、肝ミクロゾームのPC量が低下する事を報告した。これらはEverett²¹⁾らがB₆欠乏動物でMethione(Met)のtranssulfuration pathwayが低下し、methyl-¹⁴C-MetのPCへの取り込みも低下するという報告と一致している。従ってこの脂肪肝の原因物質は、Metのtranssulfuration pathwayへの流れを低下させる物質の可能性が考えられる。

要 約

1) Wistar系雄白ねずみを用い、B₆欠乏時に生ずる脂肪肝の諸性質、ならびにB₆欠乏動物の肝および血清オルニチントランスカルバミラーゼ(EC 2. 1. 3. 3.; OTC)活性への影響と尿中オロチン酸(OA)排泄量の影響について実験を行った。

2) この実験の目的はB₆欠乏時に生ずる脂肪肝の原因物質を探るためである。最初にB₆欠乏時に生ずる脂肪肝の現象解析を行ったが、肝脂質量は摂食量や終体重とは相関はみられなかった。体重100gあたりの

肝総脂質量はPair-fed control群(P群)では、すべての個体で100~200mgの範囲に入ったが、B₆欠乏群では、最頻値はコントロール群近傍に存在しその頻度は肝脂質量が高くなるに従い低下した。

3) B₆欠乏の肝および血清OTC活性への影響をみた。血清OTC活性は、B₆欠乏群で増加の傾向を示し、肝OTC活性は比活性で有意な低下を示すが、体重100gあたりの総活性では、両群間に差は認められなかった。尿中OA量は、B₆欠乏群ではP群にくらべ有意な増量が認められる。しかしB₆欠乏の肝脂肪8%以上の動物と8%以下の動物には尿中OA排泄量には差はみられなかった。

4) これらの結果よりOAがB₆欠乏時の脂肪肝の原因物質とは考え難いものと思われる。

SUMMARY

Male Wistar strain rats were used for experiments on the nature of fatty liver caused by pyridoxine-deficiency and the effect of pyridoxine-deficiency on the activities of ornithine transcarbamylase (OTC; EC 2. 1. 3. 3) of the serum and liver, and total urinary excretion of orotic acid (OA). The object of the present work was to survey substances that might induce fatty liver in pyridoxine-deficient rats. The liver lipid content / 100 g body weight in pyridoxine-supplemented rats was almost same. But that, in the deficient group, showed the higher incidence near the control and the incidence decreased with increase in the liver lipid content. Serum OTC activity in pyridoxine-deficient rats tended to be higher than in pair-fed controls. Liver OTC activity was lower in pyridoxine-deficient rats than in pair-fed controls when expressed as specific activity, but not when expressed as total activity / 100 g body weight. The OA content of the urine was higher in pyridoxine-deficient rats than in pair-fed controls. But the OA content in the urine was not correlating with the degree of lipid accumulation in pyridoxine-deficient rats. These findings showed that OA was not substance that may induce fatty liver in pyridoxine-deficient rats.

本研究を行うにあたり終始有益なるご助言、ご指導を賜りました徳島大学医学部岸野泰雄教授に深謝致します。

References

- 1) Okada, M., and Ochi, A. : The effect of dietary protein level on transaminase activities and fat deposition in vitamin B₆- depleted rat liver. *J. Biochem.*, 70, 581, (1971).
- 2) Okada, M., and Suzuki, K. : Amino acid metabolism in rats fed a high protein diet without pyridoxine. *J. Nutr.*, 104, 287, (1974).
- 3) Suzuki, K., and Okada, M. : Role of glucose on fatty liver formation in pyridoxine-deficient rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 28, 367, (1982).
- 4) Suzuki, K., and Okada, M. : Alteration of phospholipid and triglyceride metabolism in fatty liver caused by pyridoxine-deficiency in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 28, 377, (1982).
- 5) Suzuki, K., and Okada, M. : Studies on the origin of triglyceride in fatty liver caused by pyridoxine-deficiency in rats. *Nutr. Res.*, 4, 691, (1984).
- 6) Milner, J. A. : Mechanism for fatty liver induction in rats fed arginine deficient diets. *J. Nutr.*, 109, 663, (1979).
- 7) Hassan, A. S., and Milner, J. A. : Orotic acid biosynthesis in arginine-deficient rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 194, 24, (1979).
- 8) 上田敦子, 大西悦子, 斉藤史郎, 松田佳子, 辻明彦, 勝沼信彦: 血清 Ornithine carbamyl transferase の脂肪肝に対する診断的意義. *臨床化学*, 6, 125, (1978).
- 9) 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).
- 10) Brown, G. W., and Cohen, P. P. : Comparative biochemistry of urea synthesis I. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver. *J. Biol. Chem.*, 234, 1769, (1959).
- 11) Prescott, L. M., and Jones, M. E. : Modified methods for the determination of carbamyl aspartate. *Anal. Biochem.*, 32, 408, (1969).
- 12) Stajner, A., Suva, J., and Musil, F. : The determination of orotic acid in the blood serum by means of the spectrophotometric method. *Experientia*, 24, 116, (1968).
- 13) Suzuki, K., Nakamura, T., Fujita, M., Iwami, T., Abe, M., and Okada, M. : Factors affectig liver lipid content in pyridoxine-deficient rats. I. Dietary protein levels. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 22, 291, (1976).
- 14) 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).
- 15) Linkswiler, H. : Biochemical and physiological changes in vitamin B₆ deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, 20, 547, (1967).
- 16) 鈴木和彦, 岡田美津子: ピリドキシン欠乏・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. *岡山県立短期大学紀要*, 32, 20, (1988).
- 17) Kirksey, A., and Susten S. S. : Influence of different levels of dietary pyridoxine on milk composition in the rat. *J. Nutr.*, 108, 113, (1978).
- 18) 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欠之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).
- 19) 高橋忠雄: *臨床内科学全書 第5巻(I)肝・胆道・疾患*, p87 (1973)
- 20) Loo, G., and Smith, J. T. : Effect of pyridoxine deficiency on phospholipid methylation in rat liver microsomes. *Lipid*, 21, 409, (1986).
- 21) Everett, G. B., Mitchell, A. D., and Benevenga, N. J. : Methionine transamination and catabolism in vitamin B-6 deficient rats. *J. Nutr.*, 109, 597, (1979).