

# 絶食及び再摂食時の栄養動態に関する研究

2020年3月

守谷 彩



## 目 次

はじめに.....	1
第一章 短期/長期 絶食期間中の体内動態.....	3
第一節 B 群ビタミンの臓器相関及び尿中排泄量.....	4
第二節 各種酵素 .....	19
第二章 ビタミン摂取量の違いが絶食期間中の生体指標に及ぼす影響.....	25
第三章 絶食からの回復に最適な栄養素等摂取方法の検討.....	33
第一節 微量栄養素 .....	34
第二節 多量栄養素 .....	37
第三節 高脂肪食の有効性評価.....	48
まとめ .....	55
引用文献.....	56
発表論文 .....	60
謝辞 .....	61

## 略語

HPLC, high performance liquid chromatography 高速液体クロマトグラフィー

TDP, thiamin di phosphate チアミン二リン酸

CoA, coenzyme A コエンザイム A (補酵素 A)

PL, pyridoxal ピリドキサール

PLP, pyridoxal 5'- phosphate ピリドキサールリン酸

4-PIC, 4-pyridoxic acid 4-ピリドキシン酸

PLO, pyridoxal oxidase ピリドキサール酸化酵素

MNA, *N*<sup>1</sup>- methylnicotinamide *N*<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド

2-Py, *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide *N*<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド

4-Py, *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide *N*<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド

NMT, nicotinamide methyltransferase ニコチンアミド *N*-メチル基転移酵素

MNAO, *N*<sup>1</sup>- methylnicotinamide oxidase *N*<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド酸化酵素

TG, triglyceride トリグリセリド

AST, aspartate amino transferase アスパラギン酸アミノ基転移酵素

ALT, alanine amino transferase アラニンアミノ基転移酵素

## はじめに

生体にとって、エネルギーの恒常性維持は生理学的に重要な意義を持つ。エネルギーバランスが負に傾く原因として「絶食」が挙げられるが、これは、慢性疾患や摂食障害又は心理障害、術前術後の処置として、ハンガーストライキ、宗教上の理由などから起こる。また、大規模自然災害等により絶食を強いられることも想定される。

これまで、実験動物にペンギンやガチョウ、ラットなどを用いて絶食への適合反応を調べた研究があり、絶食期間中は 3 つの代謝段階を移行することが報告されている。第一段階は糖質、第二段階は脂質、第三段階はたんぱく質を主要なエネルギー源として利用しており、第二段階の期間は絶食開始時の体脂肪量が多いほど長くなる。B 群ビタミンはエネルギー代謝の補酵素としての役割を持っているため、代謝変動にあわせて必要量が変化することが予想されるが、長期絶食期間中の体内動態は調べられていない。

また、絶食後の再摂食期間中のエネルギーバランスは、給餌期とも絶食期とも異なることが知られているが、それによるビタミン要求量の変化に関する報告は見当たらない。

臨床現場においては、栄養失調状態の者が急に十分な栄養を補給した場合、リフィーディングシンドロームと呼ばれる代謝異常を発症するリスクが高いと言われている。リフィーディングシンドロームには明確な定義が存在しないため患者数は把握されていないが、低リン血症が特徴であり、軽度の症状から場合によっては生命に関わる重篤な症状を引き起こす。リフィーディングシンドロームのビタミン欠乏症としては、糖代謝の亢進に伴うビタミン B<sub>1</sub> 欠乏があり、栄養投与開始 10 日間は、予防的にビタミン B<sub>1</sub> (チアミンとして) 200~300mg を投与することが推奨されている。ただし、この量は科学的に証明された必要量というよりも、余剰分は尿中に排泄され過剰症が生じないという水溶性ビタミンの特性から多量に設定されている。また、マルチビタミン剤の投与により症状は顕在化されていないが、ビタミン B<sub>1</sub> 以外の B 群ビタミンの必要量についても検証する必要があると考えられる。

本研究の目的は、これまで明らかにされていない絶食-再摂食期間中の B 群ビタミンの体内動態を明らかにすることである。第一章では、絶食日数に伴う主要エネルギー源の変化が B 群ビタミンの体内動態に及ぼす影響を明らかにするため、短期及び長期絶食したラットの尿中、血中、臓器中の B 群ビタミンを測定することにより、B 群ビタミンの体内動態を網羅的に調べた。第二章では、体内ビタミン貯蔵量の違いが絶食期間中の生体指標に及ぼす影響を明らかにするため、ビタミン含量の異なる飼料を給餌したラットの絶食期間中の体重量、血液指標、臓器重量を比較検証した。第三章では、再摂食する栄養組成の違いが絶食からの回復に与える影響を明らかにするため、短期及び長期絶食後に高たんぱく食、高脂肪食、対照食を給餌したラットの体重量、血液指標、臓器重量を測定するとともに、尿中、血中、肝臓中の B 群ビタミンを測定し、再摂食期間中に必要な主要エネルギー源の変化及びそれに伴う B 群ビタミンの体内動態を調べた。なお、全ての研究は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を得て実施したものである。

これらの研究を通じて、最終的には、臨床栄養における極度な栄養不良状態及び再摂食時に必要なビタミンの種類及び用量を検討するためのモデル動物たるラットを確立することを目指している。



## 第一章

### 短期/長期 絶食期間中の体内動態

## 第一節 B 群ビタミンの臓器相関及び尿中排泄量

### 1. 序論

実験動物にペンギンやガチョウ<sup>1-3)</sup>、ラット<sup>4)</sup>を用いた研究において、絶食の三段階が観察されている。第一段階(Phase 1)は糖質を、第二段階(Phase 2)は脂質を、第三段階(Phase 3)はたんぱくをそれぞれ主要エネルギー源としている。Phase 1 は初期の適合段階であり、ほんのわずかしか持続しない。Phase 2 の期間は絶食前の体組成による影響を受ける。つまり、体脂肪が多いほど Phase 2 の期間が長くなり、体たんぱくの崩壊を免れる<sup>5)</sup>。他にも絶食期間中の運動量<sup>6)</sup> やホルモン分泌<sup>7)</sup>、遺伝子発現<sup>8)</sup> に関する研究も進められている。しかしながら、絶食がビタミンの体内動態に及ぼす影響は解明されていない。滋賀県立大学基礎栄養学研究室では 3 日間絶食させたラットの尿中、血液中、肝臓中、骨格筋中 B 群ビタミン濃度の測定を行ってきたが、いずれも短期絶食の影響しか反映されていない。B 群ビタミンの多くは補酵素としてエネルギー代謝に関与しているため、絶食日数に伴う主要エネルギー源の変化とともに各々の代謝に関連するビタミンの要求量が随時変化していくことが予想される。例えば、「ビタミン B<sub>1</sub> は TDP としてピルビン酸デヒドロゲナーゼの脱炭酸反応に関与しているため、糖質を主要エネルギー源とする絶食初期(Phase 1)に必要な量が増大する」、「パントテン酸は CoA の補欠分子族である 4'-ホスホパンテテインの構成成分であり、脂質代謝との関わりが深いため、脂質を主要エネルギー源とする絶食中期(Phase 2)に必要な量が増大する」、「ビタミン B<sub>6</sub> は PLP としてアミノ酸のアミノ基転移酵素、アミノ酸脱炭酸酵素等に関与しているため、たんぱくを主要エネルギー源とする絶食後期(Phase 3)で必要な量が増大する」という仮説を立てた。この仮説を検証するため、最大 9 日間絶食させたラットの尿中、血液中 B 群ビタミン濃度に加え、各種組織中のビタミン濃度を測定した。ラット組織中の全 B 群ビタミン濃度を網羅的に測定することで、正常時のビタミンの体内分布及び絶食による変動を観察することが可能となる。これにより、各ビタミンの特性と臓器相関を比較検討することも目的とした。

### 2. 実験方法

#### (1) 飼料

予備飼育期間中にラットに給餌した通常精製飼料の組成は以下の通りである(g/kg) : ビタミンフリーカゼイン, 200; L-メチオニン, 2;  $\alpha$ -コーンスターチ, 469; ショ糖, 234; コーン油, 50; ミネラル混合(AIN-93G), 35; ビタミン混合(AIN-93)<sup>9)</sup>, 10.

#### (2) 動物飼育

8 週齢の Wistar 系雄性ラット(体重 225~235 g)を日本クレア(株)より購入し、1 匹ずつラット用代謝ケージに入れて飼育した。動物飼育室は恒温恒湿(22 ± 2°C, 50~60%), 12 時間の明暗サイクル(6:00~18:00 を明)で管理した。飼料及び水は自由摂取させた。

#### (3) 実験手順

ラットに通常精製飼料を給餌して一週間予備飼育した後、対照群(CONT, n=5)の解剖を行った。残りのラットは 1 日間(S1, n=5), 2 日間(S2, n=5), 6 日間(S6, n=5), 又は Phase 3 に到達するまで(Phase 3, n=5)絶食させた。Phase 3 群のラットは 1 匹ずつ体重減少率を算出し、連続 2 日間の

上昇が認められた段階で屠殺解剖した。ラット用ギロチンで断頭したラットの全血液を EDTA-2K を含む試験管に採取し、全血又は遠心分離(7,000 × g, 30 分, 室温)によって得られた血漿を分析に用いた。即座に解剖して大脳, 心臓, 肺, 胃, 腎臓, 肝臓, 脾臓, 精巣を摘出し、重量を測定した。胃の内容物は生理食塩水で洗浄除去した。これらの臓器及び適当な大きさに切り取った大腿四頭筋(筋肉)を超純水でホモゲナイズし、分析に用いるまで-20°C で保存した。なお、パントテン酸測定用のホモジネートは 37°C で 24 時間インキュベートした後に、葉酸測定用のホモジネートは等量の 0.1M アスコルビン酸溶液を加えた後に凍結した。また、絶食期間中は毎日採尿を行った。尿は腐敗防止のために 1M の塩酸 1mL を含む三角フラスコ中に集め、尿量を測定後、分析に用いるまで-20°C で凍結保存した。

#### (4) 分析

全血中 3-ヒドロキシ酪酸濃度は測定キット(アボット ジャパン株式会社)を用いて測定した。血漿グルコース, TG, 尿素窒素, AST, ALT は富士ドライケム 3500i(富士フイルム株式会社)にて測定した。測定した尿素窒素値に 2.14 を乗じて尿素濃度として表した。血中 3-ヒドロキシ酪酸濃度は脂質異化代謝を、尿素濃度はたんぱく異化代謝を反映するため、代謝段階の確認に利用した。

尿中、血液中、組織中の B 群ビタミンの測定方法は文献 10~22 のとおりである。

#### (5) 統計処理

数値はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。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った。p 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差があるものとみなした。統計解析には GraphPad Prism 5(GraphPad Software 社)を使用した。

### 3. 結果・考察

#### (1) 絶食期間中の体重量, 臓器重量の変化

絶食期間中のラットの体重減少率を Fig. 1-1-1 に示した。体重減少率は、絶食 1 日目から 2 日目にかけて急減しており、Phase 1 に相当する。その後、およそ 5 日間の Phase 2 の期間中はほぼ一定の値を示した。体重減少率に再び上昇が認められた絶食 7~9(7.4 ± 0.5) 日目を Phase 3 と分類した。Table 1-1-1 に飼育最終日のラットの体重量と臓器重量を示した。絶食始めの 24 時間で、ラットの体重は 7%減少した。その後、絶食 2 日目から最終日までには毎日 5%ずつ減少した。大脳, 肺, 胃の重量は絶食による影響を受けなかった。肝臓は絶食 1 日目から、腎臓は絶食 2 日目から、心臓と脾臓は絶食 6 日目から重量が減少した。精巣は Phase 3 群でのみ CONT 群と比して低値を示した。CONT 群と Phase 3 群を比較すると、最も重量が減少した臓器は肝臓と脾臓であった(66%減)。

#### (2) 血液指標

Table 1-1-2 に血液成分検査値を示した。血中 3-ヒドロキシ酪酸濃度は CONT 群と比べて S1 群及び S2 群で上昇し、反対に、血漿中尿素濃度は S6 群と Phase 3 群で上昇した。この結果、S1 群, S2 群は脂質をエネルギー源として利用し、S6 群及び Phase 3 群はたんぱくをエネルギー源として利用している段階であることが確認された。S1, S2 及び S6 群の血漿グルコース濃度は CONT 群の 60%程にまで低下していたが、Phase 3 群では CONT 群と同等の値に回復した。これは、長期絶

食により崩壊した筋たんぱくより糖新生が起こったことを示唆しているかもしれない。絶食期間中、肝臓又は腎皮質で糖新生が活性化されることが知られているが、本研究において、Phase 2 群のラットの血糖値は維持されていなかった。血漿 TG は絶食 1 日目に急激に減少し(73%減)、その後は緩やかに減少した。血漿 AST は絶食による影響を受けなかったが、ALT は絶食 6 日目から CONT 群の約 1.7 倍と高値を示し、長期絶食群における肝機能の低下を示唆する結果となった。

### (3) 対照ラットのビタミン濃度

Table 1-1-3 に CONT 群のラットの尿中、血液中、各組織中 B 群ビタミン濃度を示した。全ての組織においてニコチンアミドが最も高濃度で存在した。ニコチンアミドは必須アミノ酸であるトリプトファンからも生合成されるため、ナイアシン当量としての摂取量は全 B 群ビタミン摂取量の 69%を占める。次いで飼料中に多く含まれる B 群ビタミンはパントテン酸であり、約 14%である。ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>はそれぞれ 8%、5%、3%程度であり、葉酸、ビオチン、ビタミン B<sub>12</sub>は 1%未満であった。各組織中のビタミン濃度は、およそ摂取量と一致しており、ニコチンアミドが全 B 群ビタミン量の 70%前後、パントテン酸が 20%前後であった。ビタミン B<sub>1</sub>は肝臓、精巣、心臓に高濃度で存在したが、摂取量比からのビタミン配分を考慮すると、脾臓と精巣に占める割合が高かった。同様に、ビタミン B<sub>2</sub>は肝臓、腎臓、心臓に高濃度で存在し、肝臓と脾臓に占める比率が高かった。ビタミン B<sub>6</sub>は骨格筋中に高濃度で存在していたが、これは過去の報告(13.3 ± 1.2 nmol/g muscle)<sup>23)</sup>と矛盾する。ビタミン B<sub>12</sub>は組織別に比較すると腎臓、心臓中濃度が高かった。葉酸とビオチンは、肝臓、腎臓中に高濃度で存在した。血漿葉酸濃度が低値を示した理由は不明であるが、その他の B 群ビタミンの血液中濃度及び尿中排泄量は、参照値<sup>24)</sup>に照らして正常範囲内であると判断した。

### (4) 絶食ラットのビタミン濃度

絶食期間中の尿中 B 群ビタミン排泄量を Fig. 1-1-2 に示した。ビタミン B<sub>1</sub>排泄量は絶食 1 日目から通常の約 1/10 程度と急減した(Fig. 1-1-2 A)。ビタミン B<sub>2</sub>、ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、葉酸は絶食日数に伴い徐々に減少し、絶食 4 日目からほぼ横ばいとなった(それぞれ絶食前の 20%、17%、53%、41%)(Fig. 1-1-2 B-D, G)。ナイアシン、パントテン酸、ビオチンは、絶食 1 日目、3~4 日目、1~5 日目に通常時よりも高い排泄量を示した(それぞれ通常時の最大 1.4 倍、1.7 倍、3.5 倍)(Fig. 1-1-2 E, F, H)。尿中のナイアシン排泄量が絶食 1 日目に増加すること、パントテン酸排泄量が絶食 1 日目に減少し、3 日目に増加することは過去の報告<sup>23)</sup>とも一致しているが、原因は不明である。

絶食期間中の血液中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-3 に示した。ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>6</sub>、パントテン酸は絶食 2 日目まで血中濃度が維持されていたが、絶食 2 日目から 6 日目の間に濃度が低下した(それぞれ 40%減、28%減、72%減)(Fig. 1-1-3 A, C, F)。ビタミン B<sub>2</sub>は絶食 2 日目から CONT 群よりも低値を示した(32%減)(Fig. 1-1-3 B)。葉酸とビオチンは Phase 3 群でのみ低値を示した(それぞれ 57%減、63%減)(Fig. 1-1-3 G, H)が、ビオチンは検体不足のため S6 群の測定を行っていないため、Phase 3 以前に濃度が低下していたかもしれない。血中のビタミン B<sub>12</sub>、ナイアシン濃度は絶食により変化しなかった(Fig. 1-1-3 D, E)。

絶食期間中の大脳中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-4 に示した。ビオチン濃度が絶食 1 日目に増加したことを除いて、大脳中ビタミン量に変動はみられなかった。大脳は臓器重量、ビタミン濃度とも

に絶食による影響が少なく、何らかの保護作用がはたらいっていることが考えられるが詳細は不明である。

絶食期間中の心臓中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-5 に示した。ビタミン B<sub>1</sub> は S6 群でのみ低値を示した (Fig. 1-1-5 A)。反対に、ビタミン B<sub>6</sub> は S6 群でのみ高値を示した (Fig. 1-1-5 C)。パントテン酸は Phase 2 に相当する絶食 1, 2 日目に低値を示し、その後は元に戻った (Fig. 1-1-5 F)。葉酸は絶食日数に伴い徐々に減少した (Fig. 1-1-5 G)。ピオチンは絶食 1 日目に CONT 群の約 1.7 倍に増加した (Fig. 1-1-5 H)。主に脂質が利用される Phase 2 の期間中にパントテン酸濃度が減少したことは、心臓における脂質代謝の活性化を示唆しているかもしれない。

絶食期間中の肺中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-6 に示した。ビタミン B<sub>1</sub> は絶食日数に伴い減少した (Fig. 1-1-6 A)。ビタミン B<sub>6</sub> は Phase 3 群でのみ低下した (Fig. 1-1-6 C)。ビタミン B<sub>12</sub> は絶食 2 日間の間に濃度が低下した (Fig. 1-1-6 D)。ピオチンは絶食 1 日目に増加した (Fig. 1-1-6 H)。その他の B 群ビタミンは絶食により変化しなかった。

絶食期間中の胃中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-7 に示した。ビタミン B<sub>2</sub>、パントテン酸、葉酸は絶食 1 日目から濃度が低下し、その後はほぼ一定値を示した (それぞれ 30%減, 80%減, 47%減) (Fig. 1-1-7 B, F, G)。ビタミン B<sub>1</sub> とビタミン B<sub>6</sub> は絶食 2 日目から減少した (いずれも 50%減) (Fig. 1-1-7 A, C)。ピオチンは絶食 1 日目に約 1.5 倍に増加した (Fig. 1-1-7 H)。その他の B 群ビタミンは絶食により変化しなかった。

絶食期間中の腎臓中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-8 に示した。ビタミン B<sub>2</sub> は Phase 3 群においてのみ、パントテン酸は絶食 1 日目から濃度が低下した (それぞれ 28%減, 41%減) (Fig. 1-1-8 B, F)。葉酸は絶食日数に伴い減少した (Fig. 1-1-8 G)。ピオチンは絶食 1 日目に約 1.4 倍に増加した (Fig. 1-1-8 H)。その他の B 群ビタミンは絶食により変化しなかった。

絶食期間中の肝臓中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-9 に示した。ビタミン B<sub>1</sub> とパントテン酸は Phase 3 群で CONT 群よりも高濃度に存在した (Fig. 1-1-9 A, F)。ビタミン B<sub>2</sub> とビタミン B<sub>6</sub> は絶食 1 日目から、ナイアシンは絶食 2 日目から濃度が増加した (Fig. 1-1-9 B, C, E)。肝臓はビタミンの貯蔵器官としての役割を担っている。同時に、絶食により重量の減少が激しい臓器であった。そのため、絶食期間中にも関わらず、肝臓中ビタミン濃度の上昇が認められたと考える。

絶食期間中の脾臓中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-10 に示した。ビタミン B<sub>2</sub> は絶食 6 日目から、ビタミン B<sub>12</sub> は絶食 2 日目から Phase 3 に到達する間に濃度が増加した (Fig. 1-1-10 B, D)。その他の B 群ビタミンは絶食により変化しなかった。

絶食期間中の精巣中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-11 に示した。ビタミン B<sub>2</sub> とパントテン酸は絶食 1 日目から濃度が低下した (Fig. 1-1-11 B, F)。ピオチンは絶食 1 日目に約 2.2 倍に増加した (Fig. 1-1-11 H)。その他の B 群ビタミンは絶食により変化しなかった。

絶食期間中の筋肉中 B 群ビタミン量を Fig. 1-1-12 に示した。ビタミン B<sub>1</sub> は絶食 2 日目から CONT 群の約 1/2 に減少した (Fig. 1-1-12 A)。ビタミン B<sub>2</sub> とビタミン B<sub>12</sub> は絶食 2 日目に 60%前後減少したが、Phase 3 群では元の値に戻っていた (Fig. 1-1-12 B, D)。Phase 3 群のビタミン B<sub>6</sub>、葉酸は CONT 群の約 1/2 であった (Fig. 1-1-12 C, G)。その他の B 群ビタミンは絶食により変化しなかった。

#### 4. 小括

短期/長期の絶食がラットの体重量, 臓器重量, 血液指標, B 群ビタミン代謝に及ぼす影響を検証した. 平均 7.4 日間の絶食により, ラットの体重は 3 割程度減少した. 大脳, 肺, 胃の重量は絶食により変化しなかった. 血糖値は絶食 1 日目から減少したが, Phase 3 群では通常時の値に回復した. 血漿尿素窒素, ALT は絶食 6 日目から上昇した. 尿中ナイアシン, パントテン酸, ビオチンの排泄量は絶食期間中にも関わらず増加した. 血中のビタミン B<sub>12</sub> 及びナイアシンは濃度が維持されていたが, その他の B 群ビタミンは絶食により濃度が低下した. 絶食により, 組織中濃度が変動したビタミンは下表の通りである. 絶食初期の段階でビタミン B<sub>1</sub> 濃度が低下した組織は胃と筋肉のみであった. また, パントテン酸は心臓及び腎臓中で濃度が低下することが特徴的であった. ビタミン B<sub>6</sub> については目立った特徴はなかった. 以上の結果より, 絶食期間中のエネルギー代謝とビタミンの臓器相関について検討したが, 仮説を証明するには至らなかった.

	大脳		心臓		肺		胃		腎臓		肝臓		脾臓		精巣		筋肉	
	P2	P3																
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	↑		↑		↑		↑			↑					↑			

P2 は Phase 2, P3 は Phase 3 の略.

↑ は濃度の上昇, ↓ は濃度の低下を表わす.

Table 1-1-1. Body mass and organ mass in fed and starved rats

	CONT	S1	S2	S6	Phase 3*
Final body mass (g)	252.9 ± 3.3 <sup>a</sup>	235.1 ± 2.3 <sup>ab</sup>	219.3 ± 5.6 <sup>b</sup>	182.7 ± 2.5 <sup>c</sup>	166.6 ± 5.4 <sup>c</sup>
Organ mass (g, wet wt)					
Cerebrum	1.29 ± 0.02	1.30 ± 0.01	1.28 ± 0.01	1.27 ± 0.02	1.23 ± 0.03
Heart	0.84 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>b</sup>
Lung	1.28 ± 0.08	1.19 ± 0.10	1.09 ± 0.06	1.09 ± 0.13	0.95 ± 0.06
Stomach	1.16 ± 0.02	1.15 ± 0.04	1.14 ± 0.04	1.20 ± 0.05	1.19 ± 0.08
Kidneys	1.94 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.06 <sup>ab</sup>	1.69 ± 0.03 <sup>bc</sup>	1.53 ± 0.02 <sup>cd</sup>	1.43 ± 0.04 <sup>d</sup>
Liver	11.18 ± 0.23 <sup>a</sup>	7.25 ± 0.22 <sup>b</sup>	6.07 ± 0.19 <sup>b</sup>	4.69 ± 0.12 <sup>c</sup>	3.83 ± 0.42 <sup>c</sup>
Spleen	0.75 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>c</sup>
Testes	2.75 ± 0.07 <sup>ab</sup>	2.66 ± 0.05 <sup>bc</sup>	2.66 ± 0.04 <sup>bc</sup>	2.47 ± 0.03 <sup>bc</sup>	2.45 ± 0.06 <sup>c</sup>

Values are means ± SE, n=5/group. Values within the same row that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p<0.05$ ).

CONT, non-starved control rats; S1, 1-day starved rats; S2, 2-day starved rats; S6, 6-day starved rats; Phase 3, starved for phase 3 rats.

\* Phase 3 is determined by marked late increase in rate of body mass loss (refer to Fig.1-1-1).

Table 1-1-2. Blood parameters in fed and starved rats

	CONT	S1	S2	S6	Phase 3*
<b>Whole blood</b>					
3-HBA (mg/dL)	0.62 ± 0.42 <sup>a</sup>	19.1 ± 0.5 <sup>b</sup>	26.4 ± 1.7 <sup>c</sup>	5.20 ± 1.66 <sup>a</sup>	2.86 ± 0.98 <sup>a</sup>
<b>Blood plasma</b>					
Glucose (mg/dL)	114 ± 5 <sup>a</sup>	69.4 ± 5.7 <sup>b</sup>	69.2 ± 5.3 <sup>b</sup>	66.8 ± 6.7 <sup>b</sup>	116 ± 11 <sup>a</sup>
TG (mg/dL)	252 ± 38 <sup>a</sup>	68.6 ± 6.7 <sup>b</sup>	68.0 ± 6.0 <sup>b</sup>	45.5 ± 8.5 <sup>b</sup>	38.5 ± 4.1 <sup>b</sup>
Urea (mg/dL)	44.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	37.3 ± 2.5 <sup>a</sup>	37.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	61.7 ± 3.8 <sup>b</sup>	78.2 ± 4.1 <sup>b</sup>
AST (U/L)	263.2 ± 20.7	245.4 ± 10.0	242.4 ± 20.5	240.0 ± 9.5	251.8 ± 8.4
ALT (U/L)	39.8 ± 3.8 <sup>a</sup>	29.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	31.8 ± 1.8 <sup>a</sup>	65.5 ± 10.0 <sup>b</sup>	73.3 ± 5.9 <sup>b</sup>

Values are means ± SE, n=5/group. Values within the same row that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p<0.05$ ).

CONT, non-starved control rats; S1, 1-day starved rats; S2, 2-day starved rats; S6, 6-day starved rats; Phase 3, starved for phase 3 rats.

3-HBA, 3-hydroxybutyrate; TG, triglyceride; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanin aminotransferase.

\* Phase 3 is determined by marked late increase in rate of body mass loss (refer to Fig.1-1-1).

Table 1-1-3. B-group vitamin content in each tissue, blood and urine of control fed rats

	Vitamin B <sub>1</sub> (nmol/day)	Vitamin B <sub>2</sub> (nmol/day)	Vitamin B <sub>6</sub> (nmol/day)	Vitamin B <sub>12</sub> (pmol/day)	Niacin (µmol/day)	Pantothenic acid (nmol/day)	Folates (nmol/day)	Biotin (nmol/day)
Urine	96 ± 4	65 ± 2	345 ± 4	38 ± 2	3.93 ± 0.17	567 ± 68	6.20 ± 0.68	2.96 ± 0.25
Blood	(pmol/mL WB*) 285 ± 15	(pmol/mL WB*) 208 ± 12	(nmol/mL serum) 1.46 ± 0.16	(pmol/mL plasma) 4.97 ± 0.13	(nmol/mL WB*) 121 ± 5	(nmol/mL plasma) 7.02 ± 0.39	(pmol/mL plasma) 43.2 ± 3.6	(pmol/mL plasma) 54.6 ± 3.5
Cerebrum	(nmol/g tissue) 9.1 ± 0.4	(nmol/g tissue) 6.6 ± 0.1	(nmol/g tissue) 18.3 ± 0.4	(pmol/g tissue) 35 ± 2	(nmol/g tissue) 292 ± 12	(nmol/g tissue) 61 ± 3	(nmol/g tissue) 0.52 ± 0.02	(nmol/g tissue) 0.19 ± 0.01
Heart	18.9 ± 1.5	34.4 ± 1.6	14.5 ± 1.6	202 ± 20	578 ± 46	166 ± 9	0.75 ± 0.03	0.23 ± 0.04
Lungs	5.7 ± 0.5	8.4 ± 0.6	3.6 ± 0.3	49 ± 4	367 ± 10	59 ± 8	0.78 ± 0.03	0.13 ± 0.02
Stomach	11.7 ± 1.7	11.5 ± 0.3	3.4 ± 0.6	77 ± 12	221 ± 22	51 ± 5	1.14 ± 0.02	0.27 ± 0.01
Kidneys	16.8 ± 3.1	57.2 ± 2.7	18.8 ± 1.1	269 ± 19	920 ± 27	250 ± 18	6.47 ± 0.35	1.40 ± 0.12
Liver	32.2 ± 1.8	68.0 ± 3.2	17.1 ± 0.6	144 ± 10	862 ± 34	242 ± 10	14.14 ± 0.69	1.84 ± 0.11
Spleen	7.0 ± 0.6	6.4 ± 0.4	1.4 ± 0.2	74 ± 8	645 ± 26	33 ± 4	1.17 ± 0.04	0.05 ± 0.01
Testes	25.2 ± 6.4	9.6 ± 0.8	13.9 ± 0.4	61 ± 7	186 ± 7	101 ± 8	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.01
Muscle	4.3 ± 0.2	7.5 ± 0.5	35.5 ± 1.8	38 ± 5	400 ± 24	22 ± 2	0.30 ± 0.01	0.03 ± 0.00

Values are expressed as means ± SE, n=3~5/group.

\*WB, whole blood

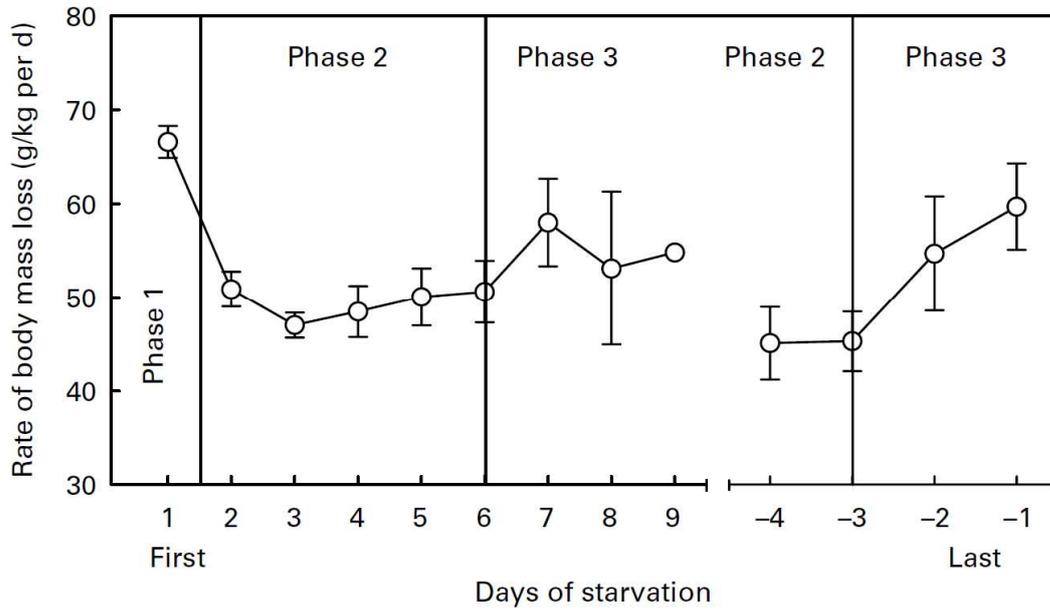


Fig. 1-1-1 Rate of body mass loss (dM/Mdt) (g/kg/day) in starved rats.

Values are means  $\pm$  SE, n=1~20/day.

dM/Mdt (dM represents the loss of body mass during  $dt=t_1-t_0$  and M is the rat body mass at  $t_0$ )<sup>1)</sup> was calculated for each animal.

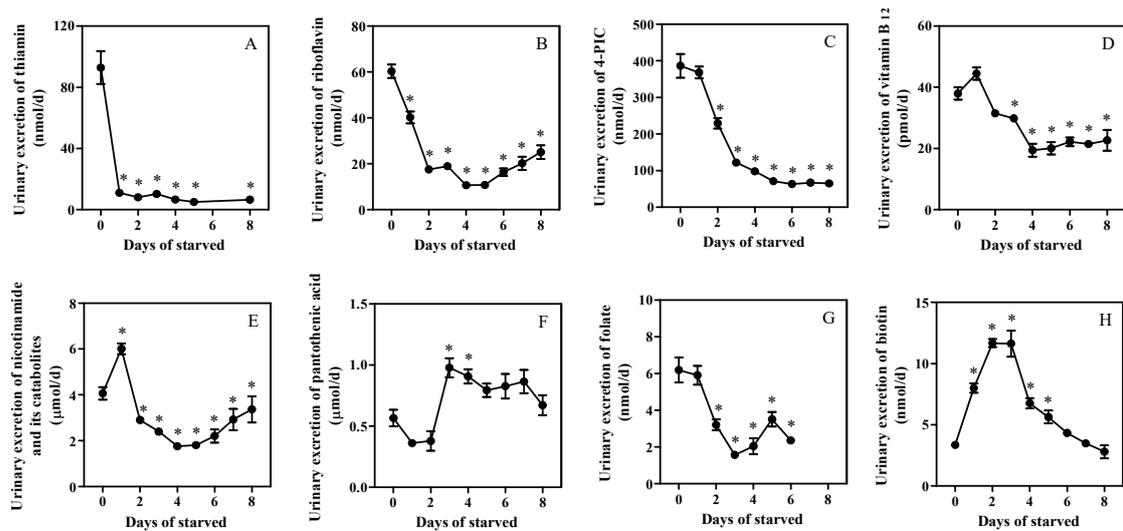


Fig. 1-1-2 Effect of starvation on urinary excretion of thiamin (A), riboflavin (B), 4-PIC (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), nicotinamide and its catabolites (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means  $\pm$  SE,  $n = 2\sim 25/\text{day}$ . \* $p < 0.05$  compared with Day 0.

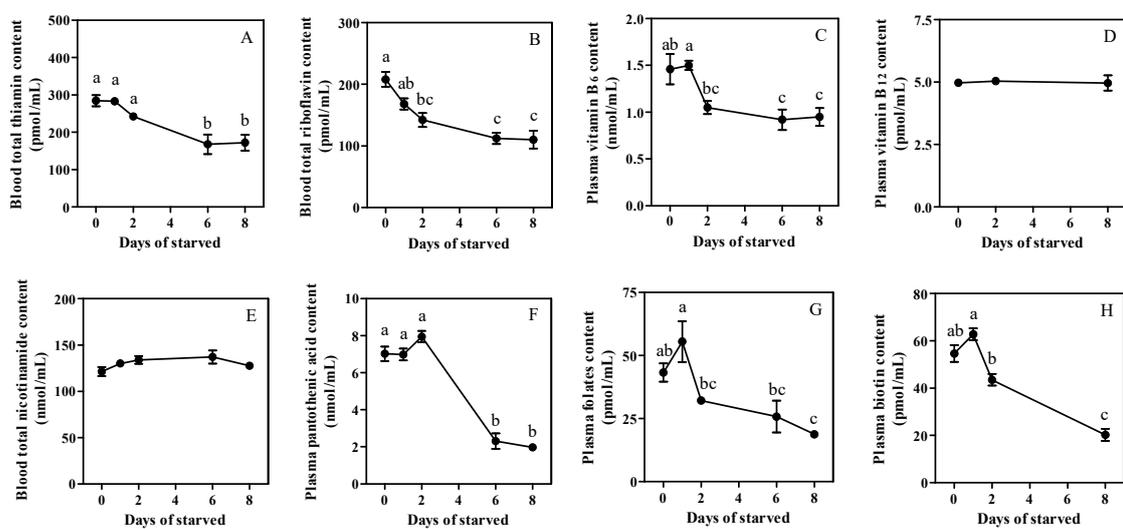


Fig. 1-1-3 Effect of starvation on blood B-group vitamin content.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means  $\pm$  SE,  $n = 3\sim 5/\text{group}$ .

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

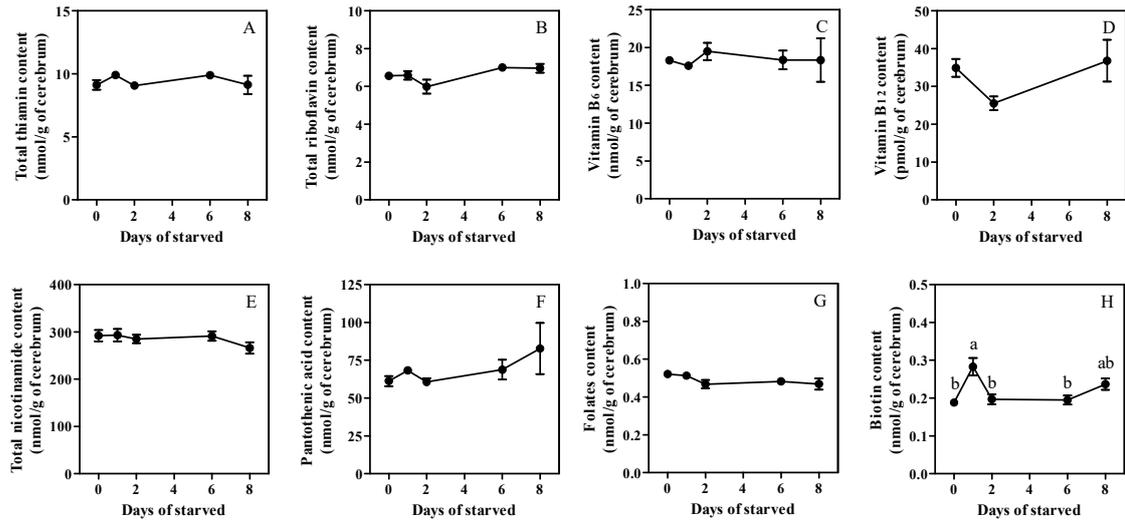


Fig. 1-1-4 Effect of starvation on B-group vitamin content in cerebrum.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means ± SE, n = 3~5/group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

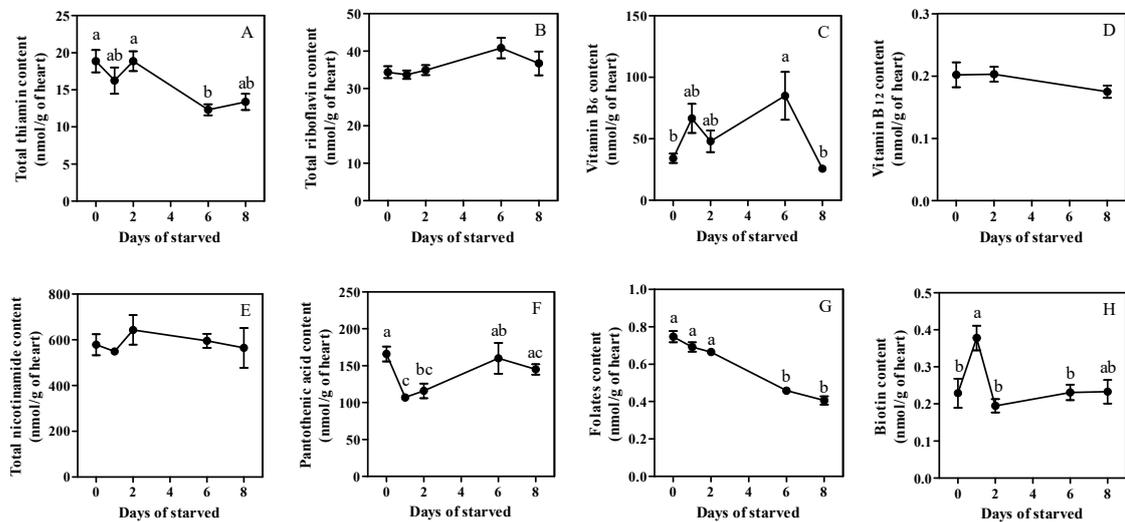


Fig. 1-1-5 Effect of starvation on B-group vitamin content in heart.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means ± SE, n = 3~5/group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

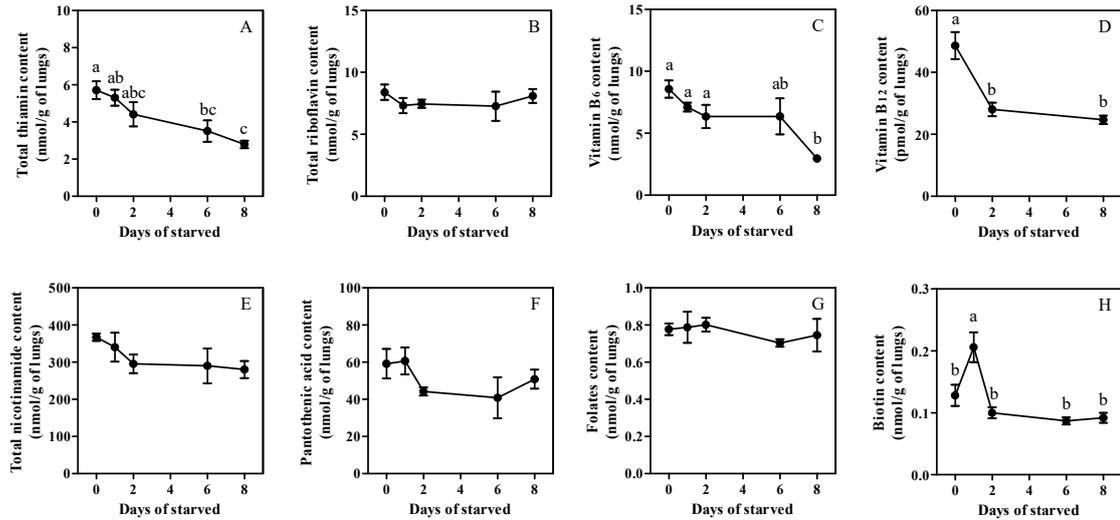


Fig. 1-1-6 Effect of starvation on B-group vitamin content in lungs.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means ± SE, n = 3~5/group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

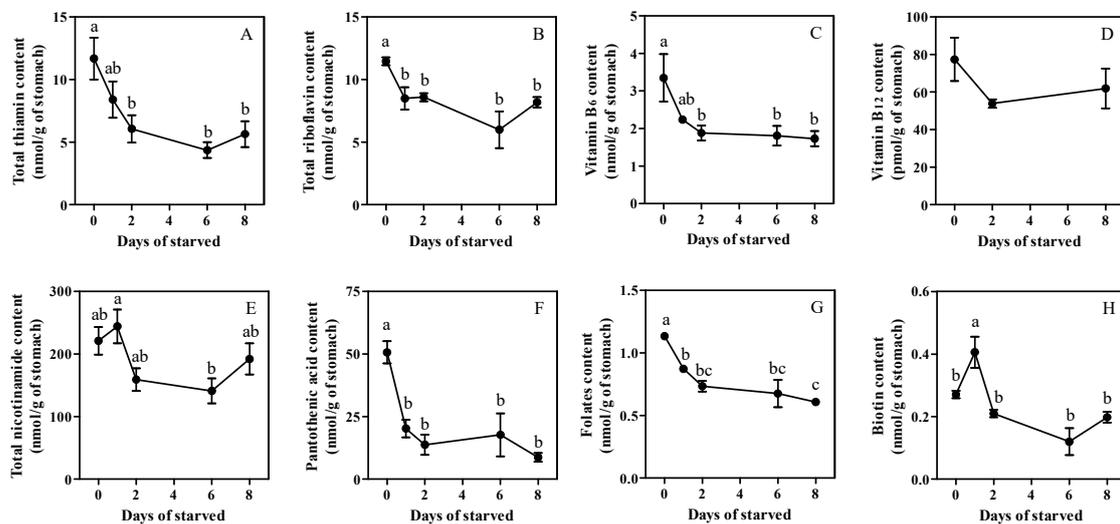


Fig. 1-1-7 Effect of starvation on B-group vitamin content in stomach.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means ± SE, n = 3~5/group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

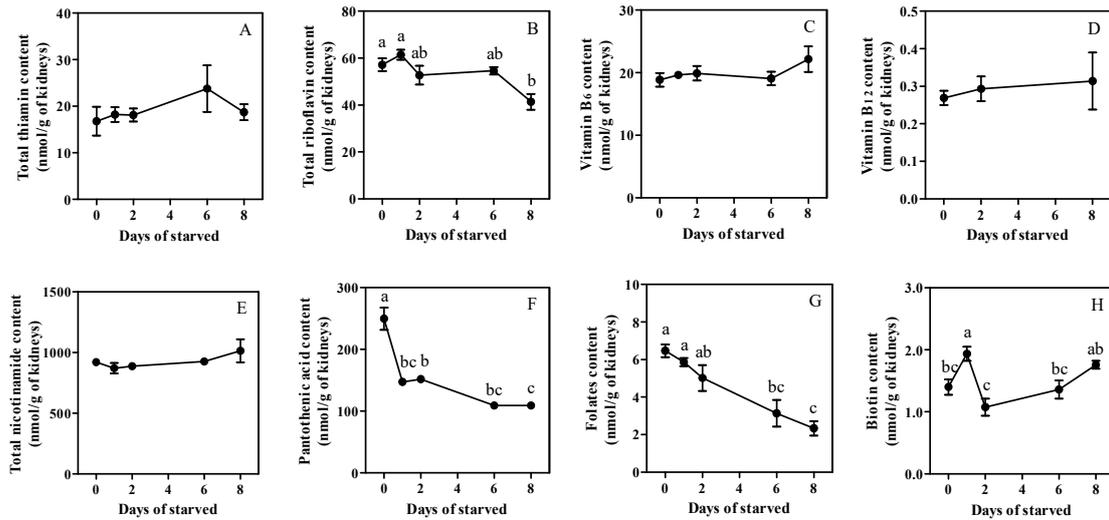


Fig. 1-1-8 Effect of starvation on B-group vitamin content in kidneys.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means ± SE, n = 3~5/group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

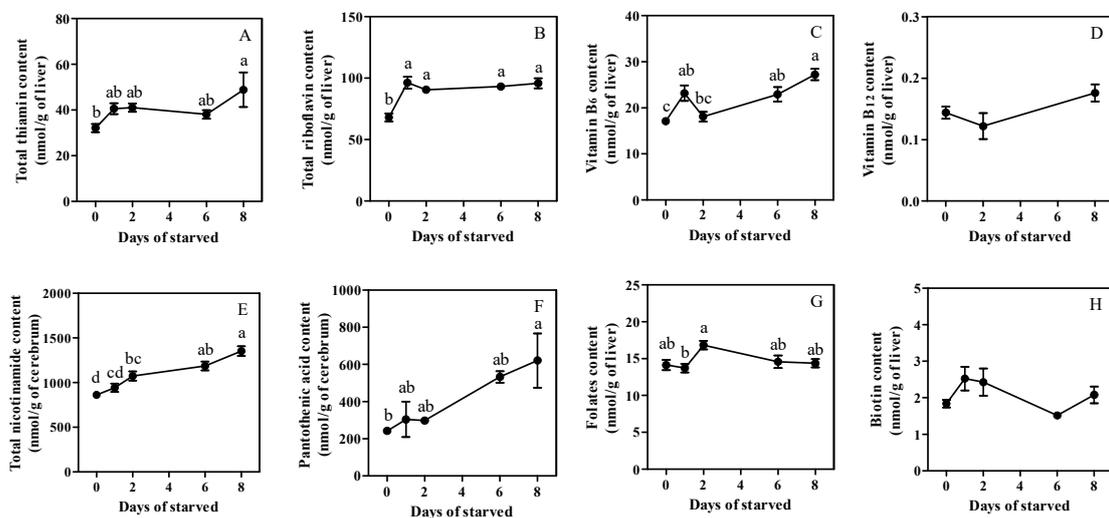


Fig. 1-1-9 Effect of starvation on B-group vitamin content in liver.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means ± SE, n = 3~5/group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

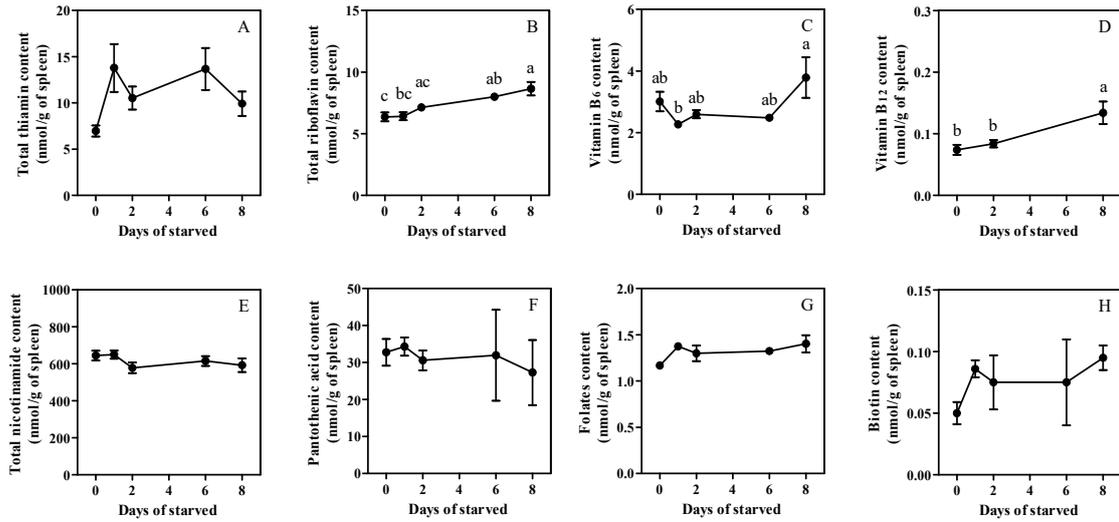


Fig. 1-1-10 Effect of starvation on B-group vitamin content in spleen.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means ± SE, n = 3~5/group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

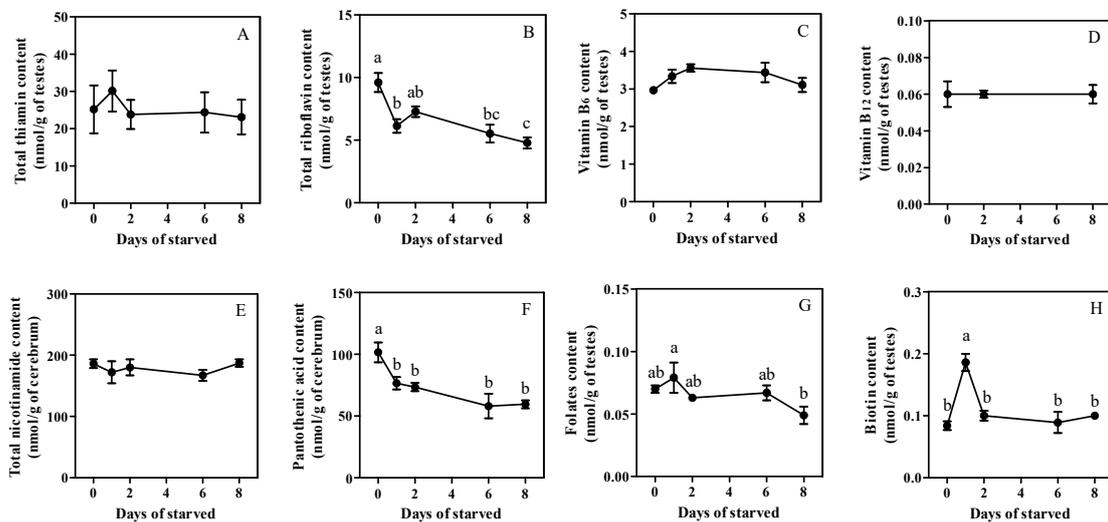


Fig. 1-1-11 Effect of starvation on B-group vitamin content in testes.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means ± SE, n = 3~5/group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

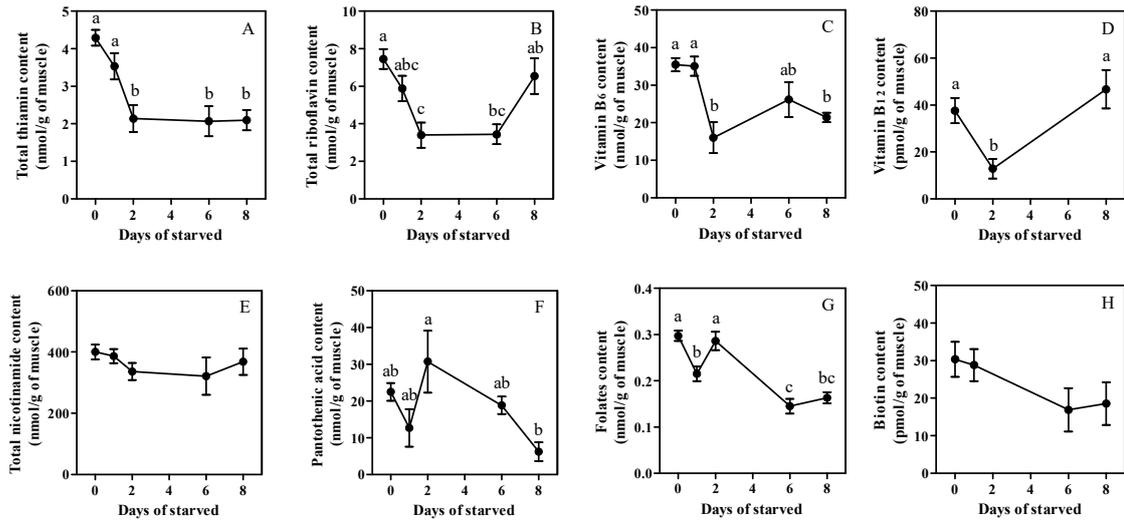


Fig. 1-1-12 Effect of starvation on B-group vitamin content in skeletal muscle.

Vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), niacin (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means  $\pm$  SE,  $n = 3\sim 5$ /group.

Phase 3 is expressed at 8 day of starvation.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 第二節 各種酵素

### 1. 序論

ヒトにおいて、尿中 MNA, 2-Py 排泄量はナイアシン栄養状態を評価する生体指標として推奨されている<sup>25)</sup>。しかしながら、MNA の尿中排泄量は絶食やエネルギー制限によって 3 倍に増加することが知られている<sup>26)</sup>。MNA はトリプトファンから *de novo* 経路で合成されるため、体たんぱく崩壊が生じる絶食時に増加することが考えられるが、このトリプトファン-ナイアシン転換率は酵素活性の大小によって左右される。本研究では、MNA を生成する NMT, 及び MNA を基質とする MNAO の活性について検討した (Fig.1-2-1)。

実験動物にラットを用いた場合、4 週齢の Sprague-Dawley 系ラットを 5 日間絶食させた場合の尿中 MNA 排泄量は摂食時の 1/3 程度であり、ナイアシン排泄量としては 1/6 程度であった<sup>27)</sup>。一方、8 週齢 Wistar 系ラットの尿中ナイアシン(ニコチンアミド+MNA+2-Py+4-Py)排泄量は絶食 6 日目から徐々に増加し、絶食 9 日目には摂食時の 3 倍程度となった<sup>28)</sup>。週齢はどちらも尿中ビタミン排泄量が安定する成熟期である。SD 系ラットと Wistar 系ラットのニコチンアミド異化代謝に系統差は認められなかったため<sup>29)</sup>、SD 系ラットにおいて尿中ナイアシン排泄量の増加が確認されなかった理由は絶食日数が短かったためであると考えた。長期の絶食やエネルギー制限によって、ラットの肝臓中 NMT 活性は増大し、MNAO 活性は低下することが報告されているが<sup>28)</sup>、短期絶食がこれらの酵素活性に及ぼす影響は知られていない。

そこで、絶食期間の違いがラットの肝ニコチンアミド代謝酵素(NMT, MNAO)の活性と尿中ナイアシン排泄比に及ぼす影響を明らかにすることを本研究の目的とした。同時に、酸化酵素作用を受けるビタミンであるビタミン B<sub>6</sub>についても検討した。

### 2. 実験方法

#### (1) 飼料

第一節に同じ。

#### (2) 動物飼育

第一節に同じ。

#### (3) 実験手順

ラットに通常精製飼料を給餌して一週間予備飼育した後、対照群(CONT, n=6)の解剖を行い肝臓を摘出した。残りのラットは 1 日間(S1, n=4), 2 日間(S2, n=4), 3 日間(S3, n=5), 6 日間(S6, n=6), 又は Phase 3 に到達するまで(Phase 3, n=7)絶食させた。Phase 3 群の絶食日数は  $8.6 \pm 0.2$  日間であった。それぞれ飼育最終日に肝臓を摘出し、即座にニコチンアミド代謝酵素の活性を測定した。また、CONT 群と S6 群の PLO 活性を測定した。

#### (4) 尿中ナイアシン、ビタミン B<sub>6</sub>排泄量及び血漿中ビタミン B<sub>6</sub>濃度の測定

尿中のニコチンアミド、2-Py、4-Py 及び MNA 排泄量は HPLC 法にて測定した。

尿中ビタミン B<sub>6</sub>排泄量は尿 0.1 mL に塩酸 0.9 mL と 1M NaOH 0.05 mL を加えてオートクレーブで反応させ、微生物学的定量法にて測定した。また、異化代謝産物である 4-PIC を HPLC 法にて測定した。血漿中ビタミン B<sub>6</sub>(PLP+PL)は HPLC 法にて測定した。

## (5) 酵素活性の測定

### i. 酵素源の調製

新鮮な肝臓 1g に対して 5 mL の 0.5 M KPB (pH 7.0) を加え、テフロン乳棒付き Potter-Elvehjem ガラスホモジナイザーを用いて室温で約 10 秒間緩やかにホモゲナイズした。ホモジネートは氷中に保存し、即座に酵素活性測定のための処理を行った。

### ii. NMT 活性の測定

肝 NMT 活性は文献 30 に示した方法で測定した。すなわち、終濃度で 50 mM KPB (pH 7.0), 10 mM ニコチンアミド, 1 mM SAM, 20% 酵素源を含む試験管を 37°C の温水中で 30 分間加温し、4% PCA で反応停止した。1 分間振とう後、遠心分離して上清を別の試験管に移した。残りの沈殿物は 0.75% PCA を加えて粉碎し、5 分間振とう後、遠心分離して集めた上清を先の上清とあわせた。SAM を入れずに同様の操作を行いブランクとした。上清 0.3 mL を使用してアセトフェノン縮合蛍光法にて反応させ、HPLC 法にて MNA 量を測定した。

### iii. MNAO 活性の測定

肝 MNAO 活性は文献 31 に示した方法で測定した。すなわち、終濃度で 20 mM KPB (pH 7.0), 0.8 mM MNA, 10 mM NH<sub>4</sub>Cl を含む試験管を 37°C の温水中で 5 分間加温し、一定時間おきに 10% 酵素源を加えて反応させた。正確に 10 分後、0.6% PCA で反応停止させた。予め PCA を入れた試験管に酵素源を加えたものをブランクとした。反応後の試液に内部標準としてイソニコチンアミドを加えた後、NMT と同様の方法で上清を集めた。あわせた上清 1 mL を試料とし、HPLC 法にて 2-Py, 4-Py 量を測定した。

### iv. PLO

肝 PLO 活性は、Merrill<sup>32)</sup>及び Bode<sup>33)</sup>の方法を参考に測定した。すなわち、終濃度 0.1M KPB (pH 7.0), 0.05 mM ピリドキサル塩酸塩を含む試験管を 37°C の温水中で 5 分間加温し、一定時間おきに 20% 酵素源を加えて 30 分間反応させた後、1.4% PCA で反応停止した。遠心分離した上清中の 4-PIC 量を HPLC 法で測定した。反応液中のピリドキサルが 4-PIC 測定時の妨害ピークとならないことを確認した。

## (6) 統計処理

数値はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。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 Dunnett の多重比較検定を行った。p 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差があるものとみなした。統計解析には GraphPad Prism 5 (GraphPad Software 社)を使用した。

## 3. 結果・考察

### (1) 絶食がラットの肝 NMT, MNAO 活性及び尿中ナイアシン排泄量に及ぼす影響

絶食日数の異なるラットの肝 NMT, MNAO 活性を Fig. 1-2-2 に示した。肝 NMT 活性は絶食 6 日目までは変化せず、Phase 3 にあたる絶食 7 日目以降から増加をはじめ、最終日には約 3 倍の活性を示した (Fig. 1-2-2 A)。肝 MNAO 活性は絶食日数に伴い徐々に減少し、最終的には 2-Py 生成酵素は通常時の 1/4 程度 (Fig. 1-2-2 B), 4-Py 生成酵素は 1/13 程度 (Fig. 1-2-2 C) にまで低下した。

絶食期間中のラットの尿中ナイアシン排泄量を Fig. 1-2-3 に示した。ニコチンアミドは絶食 1 日目に通常時の約 2 倍に増加したが、絶食 2 日目から 8 日目までは元の値に戻った (Fig. 1-2-3A)。MNA は絶食 2~4 日目に 40%ほど減少したが、その後増加して絶食 8 日目には通常時の 1.5 倍の排泄量を示した (Fig. 1-2-3 B)。2-Py, 4-Py は絶食 1 日目に 1.5 倍程度増加したが、絶食 2 日目からは通常時の約 1/2 であった (Fig. 1-2-3 B, C)。

4-Py 生成 MNAO 活性は他のニコチンアミド代謝酵素の活性よりも高いため、対照群のラットの尿中ナイアシン排泄量に占める 4-Py の割合は約 80%と最大であるが、絶食により活性が低下すると約 50%に低下した。反対に、MNA 比は通常状態では尿中ナイアシン排泄量の 10%未満であるが、絶食により約 30%に増加した。肝 NMT 活性は生死の境である絶食 9 日目に急激に上昇していたため、尿中 MNA 排泄比の増加は NMT 活性の増大というよりもむしろ MNAO 活性の低下に起因していると考えた。

#### (2) 絶食がラットの肝 PLO 活性及び血漿中、尿中ビタミン B<sub>6</sub> 量に及ぼす影響

絶食がビタミン B<sub>6</sub> 代謝に及ぼす影響を Fig. 1-2-4 に示した。肝 PLO 活性は 6 日間の絶食で約 1/3 に減少した (Fig. 1-2-4 A)。血漿中ビタミン B<sub>6</sub> 量は 6 日間の絶食により約 1/3 となったが、PLP と PL の比率は変化しなかった (Fig. 1-2-4 B)。尿中ビタミン B<sub>6</sub> 量は絶食日数に伴い徐々に減少し、1/3 程度となった。また、尿中ビタミン B<sub>6</sub> のうち、異化代謝産物である 4-PIC が占める割合は約 85%であった (Fig. 1-2-4 C)。MNAO は絶食により活性が低下すると尿中の 2-Py, 4-Py 比を減少させたが、PLO 活性は低下を示しても尿中 4-PIC 比に影響を与えなかった。

#### 4. 小括

絶食による各種酵素活性の変動を確認した結果、ラット(体重 250g)の肝臓における 2-Py 生成 MNAO は絶食 3 日目から 6 日目の間に、4-Py 生成 MNAO は絶食 3 日目に活性が低下することが示された。また、肝 NMT は短期間の絶食では変化せず、長期間の絶食で活性が増大することを証明した。

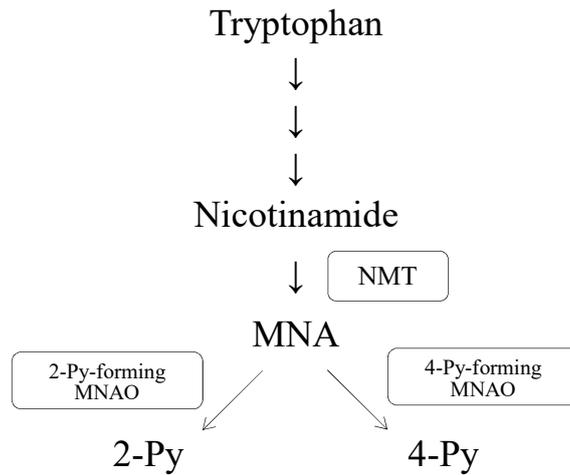


Fig. 1-2-1 Tryptophan-niacin pathway.

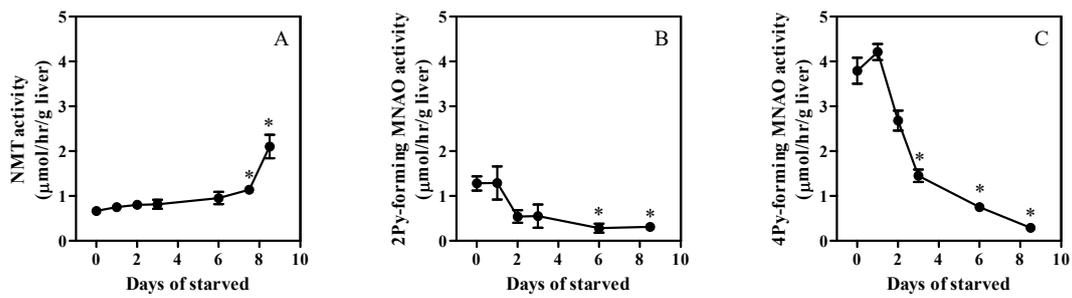


Fig. 1-2-2 Effect of starvation on enzyme activities involved in nicotinamide metabolism.

NMT (A), 4-Py forming MNAO (B) and 2-Py forming MNAO (C).

\* $p < 0.05$  compared with control rat (Day 0).

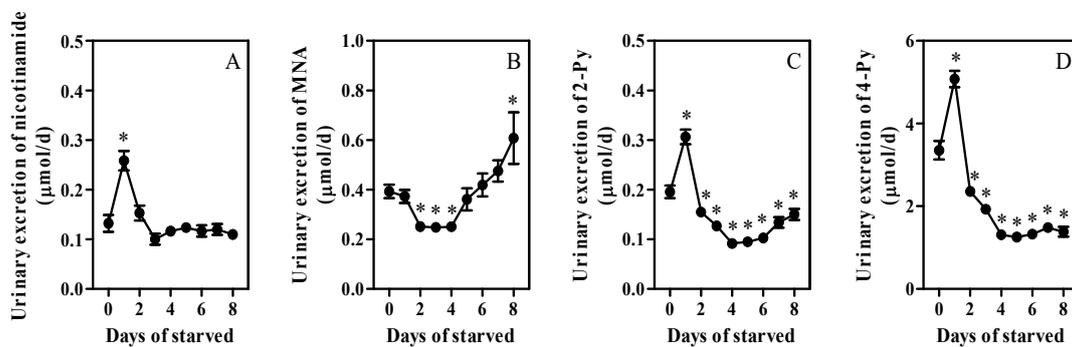


Fig. 1-2-3 Urinary excretion of niacin during starvation.

Nicotinamide (A), MNA (B), 2-Py (C) and 4-Py (D). \* $p < 0.05$  compared with Day 0.

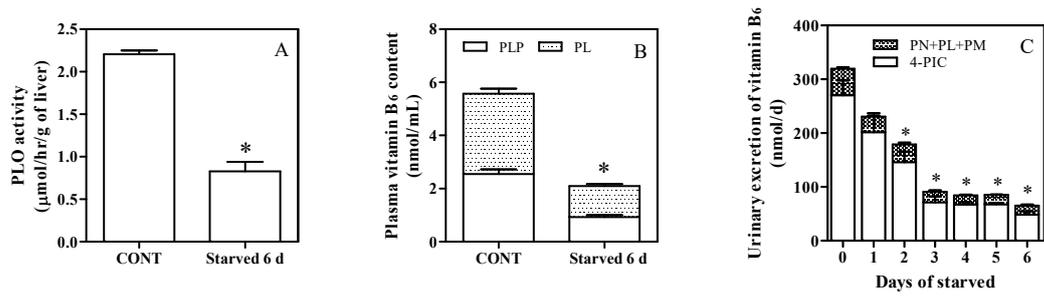


Fig. 1-2-4 Effect of starvation on vitamin B<sub>6</sub> metabolism.

Liver PLO activity (A), plasma vitamin B<sub>6</sub> content (B), urinary excretion of vitamin B<sub>6</sub> (C).

\*  $p < 0.001$  compared with control rat.



## 第二章

ビタミン摂取量の違いが

絶食期間中の生体指標に及ぼす影響

## 1. 序論

水溶性ビタミンは代謝回転の速い栄養素であり、体液に溶解するため体内での貯蔵量に限りがある。水溶性ビタミンの欠乏症は、脚気やウェルニッケ脳症(ビタミン B<sub>1</sub> 欠乏症)、ペラグラ(ナイアシン欠乏症)、壊血病(ビタミン C 欠乏症)など症状が重篤なため、日常的な摂取が必要である。第一章において、最小必要量の 3 倍以上のビタミンを摂取したラットの各組織中ビタミン量は長期絶食により減少した。これは体内のビタミン量が飽和状態であったためだと考えられる。仮に体内のビタミン量が飽和値に達していなかった場合、絶食中にエネルギー欠乏に先立ってビタミン欠乏の症状を呈するかもしれない。そこで、絶食前のビタミン摂取量の違いが絶食期間中の生体指標に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験方法

### (1) 飼料

各試験食の組成を Table 2-1 に示した。また、使用したビタミン混合に含まれる各ビタミン量を Table 2-2 に示した。

### (2) 動物飼育

7 週齢の Wistar 系雄性ラット(体重 190~200 g)を日本クレア(株)より購入し、1 匹ずつラット用代謝ケージに入れて飼育した。動物飼育室は恒温恒湿(22 ± 2°C, 50~60%), 12 時間の明暗サイクル(6:00~18:00 を明)で管理した。飼料及び水は自由摂取させた。

### (3) 実験手順

ラットを 2 群に分け、飼料 100 g 中にビタミン混合を 1 g(V-1.0 群, n=4)又は 0.3 g(V-0.3 群, n=4)含む飼料を 10 日間給餌した後、6 日間絶食させた。飼育期間中、毎日飼料摂取量と体重変化量を測定した。また、絶食 0~6 日目まで 24 時間尿の採尿を行い、尿中の B 群ビタミン排泄量の推移を調べた。飼育最終日にラットを断頭屠殺し、即座に解剖して臓器(大脳、心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓、精巣)重量を測定した。また、EDTA-2K を含む試験管に血液を採集し、遠心分離(7,000 × g, 30 分, 室温)によって得られた血漿を分析に用いた。

### (4) 分析

血漿中グルコース, TG, 尿素窒素, AST, ALT, クレアチニンは富士ドライケム 3500i(富士フイルム株式会社)にて測定した。尿中 B 群ビタミンの測定方法は第一章に同じである。

### (5) 統計処理

数値はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。値の比較には *t* 検定を用い、*p* 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差があるものとみなした。統計解析には GraphPad Prism 5(GraphPad Software 社)を使用した。

## 3. 結果・考察

### (1) 飼料中のビタミン量の違いが飼料摂取量及び体重量に及ぼす影響

絶食前の V-1.0 群と V-0.3 群の飼料摂取量は、それぞれ 1 日当たり 18.0 ± 0.2 g, 18.3 ± 0.7 g であり、飼料中のビタミン量の違いは摂食量に影響を及ぼさなかった。そのため、V-0.3 群のビタミン

摂取量は V-1.0 群の 1/3 程度であった。絶食期間中のラットの体重減少率を Fig. 2-1 に示した。ビタミン摂取量の違いは、摂食期、絶食期を通じてラットの体重量に影響を与えなかった。

(2) ビタミン摂取量の違いが絶食後の血液指標に及ぼす影響

絶食 6 日後のラットの血液生化学検査値を Table 2-3 に示した。測定した全ての項目(グルコース, TG, 尿素窒素, AST, ALT, クレアチニン)について有意差は認められなかった。

(3) ビタミン摂取量の違いが絶食後の臓器重量に及ぼす影響

絶食 6 日後のラットの各種臓器重量を Table 2-4 に示した。測定した全ての項目(大脳, 心臓, 肺, 腎臓, 肝臓, 脾臓, 精巣)について有意差は認められなかった。

(4) ビタミン摂取量の違いが絶食期間中の尿中ビタミン排泄量に及ぼす影響

V-1.0 群のラットの絶食 0~6 日目の尿中 B 群ビタミン排泄量を Fig. 2-2 に示した。V-1.0 群には第一章と同じ組成の飼料を給餌したため、尿中ビタミンも同様の排泄パターンを示した。Fig. 2-3 に V-0.3 群のラットの絶食 0~6 日目の尿中 B 群ビタミン排泄量を示した。ビタミン B<sub>1</sub> は絶食以前から尿中への排泄量が急減していたため、絶食期間中に変動はみられなかった(Fig. 2-3A)。ビタミン B<sub>2</sub> は絶食 1 日目に摂食時の約 3 倍に増加した(Fig. 2-3B)。これは、24 時間絶食後のヒトの尿中ビタミン B<sub>2</sub> 排泄量が絶食前のおよそ 2.6 倍に増加したこと<sup>23)</sup>と類似しており、尿中ビタミン B<sub>2</sub> 排泄量は摂取量と絶食という因子により、複雑な挙動を示すことが確認された。ビタミン B<sub>6</sub>、葉酸もまた同様であり、ビタミン摂取量の少ない V-0.3 群において絶食による排泄量増加が認められた(Fig. 2-3 C, D)。V-0.3 群のビオチン排泄は V-1.0 群と同じパターンを示した(Fig. 2-3 E)。

近年、栄養素摂取量を反映するバイオマーカーとして尿の利用が注目を集めている。滋賀県立大学基礎栄養学研究室では水溶性ビタミンについて、ビタミン B<sub>12</sub> を除く 8 種類のビタミンの尿中排泄量は摂取量を鋭敏に反映することを証明してきた<sup>34-35)</sup>。尿中排泄量を用いてビタミン栄養状態を評価するためには、各ビタミンの尿中への排泄パターンに影響を及ぼす因子の解明が不可欠である。本研究において、V-0.3 群の尿中ビタミン B<sub>2</sub>、ビタミン B<sub>6</sub>、葉酸排泄量が絶食 1 日目に通常時の 3 倍以上に増加していたという事実は、これらのビタミンの尿中排泄量の基準値を設定する上で重要な意味をもつかもかもしれない。

#### 4. 小括

飼料中ビタミン含量の違いが絶食期間中のラットの生体指標に及ぼす影響を検討した結果、絶食前のビタミン摂取量の違いは、絶食期間中のラットの体重量、血液指標、臓器重量に影響を及ぼさないことが示された。また、ビタミン摂取量の少ない V-0.3 群においても絶食期間中にビタミン欠乏症を発症しなかった。したがって、ビタミンの積極的な摂取は絶食期間中の悪影響を緩和する手段とはなり得ないことが証明された。しかしながら、本研究で用いたラットはすでに成熟期にあつたため、10 日間の試験食摂取では体内のビタミン貯蔵量の減少率が低く、十分量のビタミンが保持されていた可能性がある。そのため、慢性的な栄養状態不良者のモデルとしてラットを用いる場合には、さらなる検討が必要であろう。

Table 2-1. Composition of the diet

	V-1.0	V-0.3
	(%)	(%)
Vitamin-free milk casein	20.0	20.0
L-methionine	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	46.9	47.3
Sucrose	23.4	23.7
Corn oil	5.0	5.0
Mineral mixture (AIN-93-G)	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93)	1.0	0.3
Total	100.0	100.0

Table 2-2. Composition of vitamin mixture (AIN-93) <sup>9)</sup>

Vitamin	
Nicotinic acid	3.000
Ca Pantothenate	1.600
Pyridoxine-HCl	0.700
Thiamin-HCl	0.600
Riboflavin	0.600
Folic acid	0.200
D-Biotin	0.020
Vitamin B-12 (cyanocobalamin) (0.1% in mannitol)	2.500
Vitamin E (all- <i>rac</i> - $\alpha$ -tocopheryl acetate) (500 IU/g)	15.000
Vitamin A (all- <i>trans</i> -retinyl palmitate) (500,000 IU/g)	0.800
Vitamin D <sub>3</sub> (cholecalciferol) (400,000 IU/g)	0.250
Vitamin K (phylloquinone)	0.075
Powdered sucrose	974.655

Values are expressed as g per kg of vitamin mixture.

Table 2-3. Effect of vitamin intake on blood parameters in starved rats

	V-1.0	V-0.3
Glucose (mg/dL)	25.0 ± 3.0	29.0 ± 5.9
TG (mg/dL)	45.5 ± 8.5	38.5 ± 14.9
BUN (mg/dL)	28.9 ± 1.8	25.7 ± 3.0
AST (U/L)	240 ± 10	289 ± 28
ALT (U/L)	65.5 ± 10.0	40.8 ± 3.8
Creatinine (mg/dL)	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03

Values are means ± SE, n=4/group.

Table 2-4. Effect of vitamin intake on organ mass in starved rats

	V-1.0	V-0.3
(g, wet wt)		
Cerebrum	1.29 ± 0.02	1.28 ± 0.06
Heart	0.76 ± 0.16	0.64 ± 0.02
Lungs	0.87 ± 0.08	0.97 ± 0.09
Kidneys	1.49 ± 0.11	1.50 ± 0.04
Liver	5.20 ± 0.45	5.08 ± 0.15
Spleen	0.47 ± 0.07	0.33 ± 0.01
Testes	2.66 ± 0.16	2.62 ± 0.08

Values are means ± SE, n=4/group.

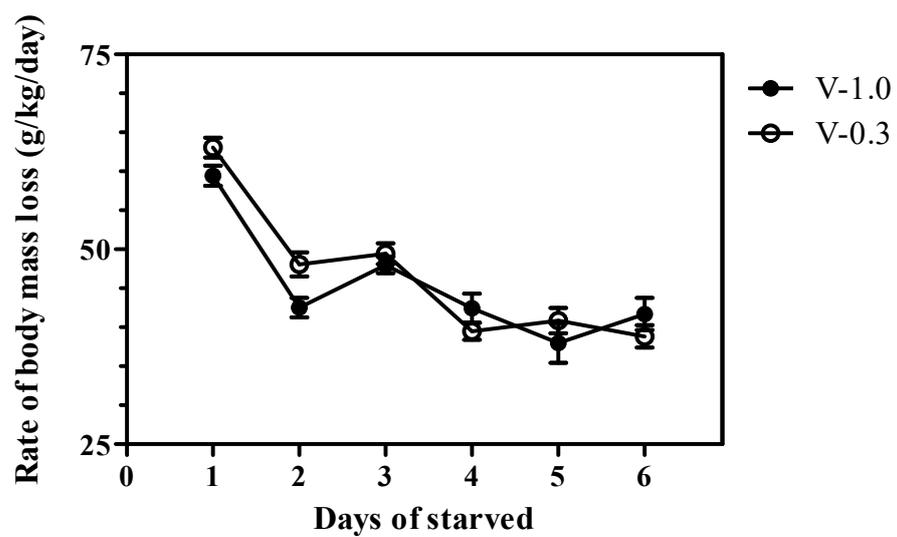


Fig. 2-1 Rate of body mass loss (dM/Mdt) (g/kg/day)<sup>1)</sup> in starved rat.  
 Values are means  $\pm$  SE, n=4/group.

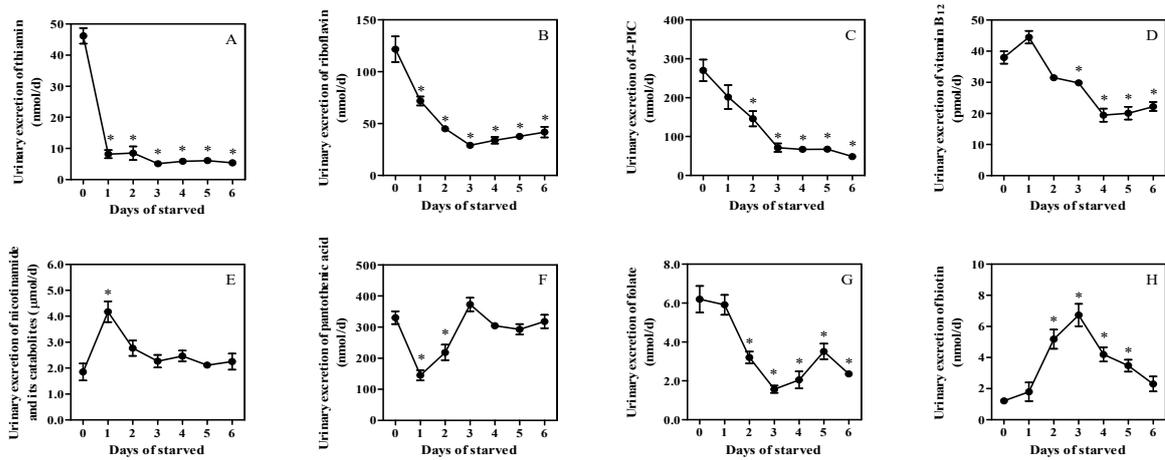


Fig. 2-2 Urinary excretion of B-group vitamin (V-1.0).

Thiamin (A), riboflavin (B), 4-PIC (C), vitamin B<sub>12</sub> (D), nicotinamide and its catabolites (E), pantothenic acid (F), folates (G) and biotin (H).

Values are means  $\pm$  SE, n = 4/group. \* $p < 0.05$  compared with Day 0.

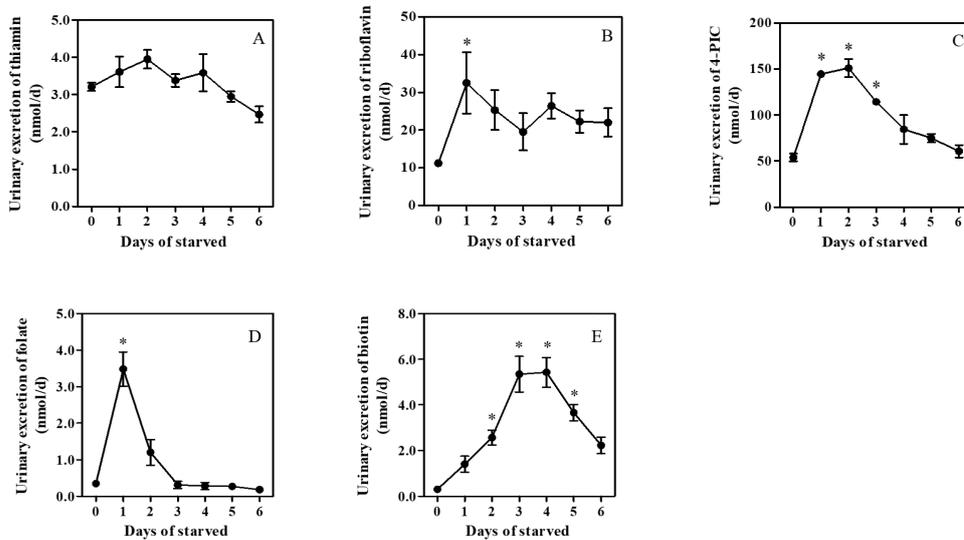


Fig. 2-3 Urinary excretion of B-group vitamin (V-0.3).

Thiamin (A), riboflavin (B), 4-PIC (C), folates (D) and biotin (E).

Values are means  $\pm$  SE, n = 4/group. \* $p < 0.05$  compared with Day 0.



## 第三章

絶食からの回復に最適な栄養素等摂取方法の検討

## 第一節 微量栄養素

### 1. 序論

水溶性ビタミンは他の栄養素に比べ体内貯蔵量が少ないため、絶食により早期に枯渇すると考えられる。そのため、再摂食期には積極的な水溶性ビタミンの摂取が絶食からの回復にとって有効であるかもしれない。ビタミンの必要量が再摂食期に増加するの否かを調べるために、絶食ラットにビタミン含量の異なる飼料を再給餌した。

### 2. 実験方法

#### (1) 飼料

第二章に同じ。

#### (2) 動物飼育

第二章に同じ。

#### (3) 実験手順

試験開始前にラットを2群に分け、飼料100g中にビタミン混合を1.0g(V-1.0群, n=4)又は0.3g(V-0.3群, n=4)含む飼料を与えて10日間予備飼育した。その後、3日間絶食させ、絶食前に摂取していた飼料と同じ飼料を3日間再給餌した。飼育最終日にラットを断頭屠殺し、即座に解剖して臓器(大脳、心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓、精巣)重量を測定した。また、EDTA-2Kを含む試験管に血液を採集し、遠心分離(7,000×g, 30分, 室温)によって得られた血漿を分析に用いた。

#### (4) 分析

血漿中グルコース, TG, 尿素窒素, AST, ALT は富士ドライケム(富士フイルム株式会社)にて測定した。

#### (5) 統計処理

数値はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。値の比較には *t* 検定を用い、*p* 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差があるものとみなした。統計解析には GraphPad Prism 5(GraphPad Software 社)を使用した。

### 3. 結果・考察

#### (1) 再給餌期間中の飼料中ビタミン量の違いが体重回復に及ぼす影響

絶食前, 絶食3日後, 再給餌3日後のラットの体重量を Table 3-1-1 に示した。いずれの段階においても群間に差は認められなかった。飼料摂取量は同等であったため、ビタミン摂取量の違いは絶食からの体重回復に影響を及ぼさなかった。

#### (2) 再給餌期間中の飼料中ビタミン量の違いが血液指標に及ぼす影響

再給餌後のラットの血液指標を Table 3-1-2 に示した。V-0.3 群の血漿グルコース, TG 濃度は V-1.0 群の 1.8 倍であった。これは、ビタミン摂取量の違いというよりも摂食時間と採血時間の違いに起因しているものと考えられる。その他の血液指標に差は認められなかった。

### (3) 再給餌期間中の飼料中ビタミン量の違いが臓器重量回復に及ぼす影響

再給餌後のラットの臓器重量を Table 3-1-3 に示した. 測定した全ての項目において群間に差は認められなかった.

## 4. 小括

再給餌期間中の飼料中ビタミン含量の違いが絶食からの回復に及ぼす影響を検討した. 本研究は予備飼育期, 再給餌期ともに飼料中のビタミン含量が異なるため二つの因子が絡んでいるが, よりビタミン貯蔵量の少ない V-0.3 群において V-1.0 群と同じ回復度を示したことは, 絶食後の再給餌期にビタミンの必要量は増大しないことを示唆している. つまり, 必要量よりも多いビタミンを摂取しても, 絶食からの回復には無効であった.

Table 3-1-1. Effect of vitamin intake on body mass

	V-1.0	V-0.3
Body mass (g)		
Initial	241 ± 4	244 ± 4
Starved 3-day	206 ± 4	206 ± 3
Final	243 ± 4	241 ± 5

Values are means ± SE, n=4/group.

Table 3-1-2. Effect of vitamin intake on blood parameters in refed rats

	V-1.0	V-0.3
Glucose (mg/dL)	66.0 ± 3.5	117 ± 8 **
TG (mg/dL)	84.7 ± 9.4	152 ± 25 *
BUN (mg/dL)	23.3 ± 2.7	24.2 ± 0.9
AST (U/L)	258 ± 12	234 ± 22
ALT (U/L)	42.7 ± 2.3	42.5 ± 5.1

Values are means ± SE, n=4/group. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 compared with V-1.0 rat.

Table 3-1-3. Effect of vitamin intake on organ mass in refed rats

	V-1.0	V-0.3
(g, wet wt)		
Cerebrum	1.29 ± 0.04	1.27 ± 0.02
Heart	1.02 ± 0.06	1.28 ± 0.21
Lungs	0.84 ± 0.14	0.80 ± 0.02
Kidneys	1.92 ± 0.11	1.92 ± 0.05
Liver	12.86 ± 0.84	12.68 ± 0.46
Spleen	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.01
Testes	2.82 ± 0.27	2.88 ± 0.07

Values are means ± SE, n=4/group.

## 第二節 多量栄養素

### 1. 序論

本章第一節の研究において、微量栄養素であるビタミンが再給餌期間中のラットの生体指標に及ぼす影響を検討した結果、有効性を示さないことが示唆された。そこで、本研究では多量栄養素について着目した。

絶食後の再給食で考慮すべき事項の一つとして、リフィーディングシンドロームが挙げられる。この疾患が最初に文献で報告されたのは第二次世界大戦後のことであり、強制収容所から解放された人々の間で致命的な下痢、心不全、昏睡や痙攣などの神経学的合併症が引き起こされたことが報告されている。当初、本病態の発生機序は不明であったが、現在では、インスリン分泌の増加によるグリコーゲン、脂肪、たんぱく質の合成刺激に伴うミネラル(リン酸塩、マグネシウム)やチアミンの消費、Na-K ATPase を介したカリウム等の細胞内取り込みによる、血清中のリン酸塩、カリウム、マグネシウム濃度の低下、また、基礎代謝率の急速な変化の結果として起きると説明されている<sup>36-37)</sup>。

脂質(ケトン体)を利用していた絶食期から炭水化物を利用する再摂食期へのエネルギー源の急激な変換に伴いインスリンが増大するとされているが、絶食日数により主要エネルギー源としている栄養素が異なるため、短期/長期の各絶食段階からの再給餌について検討した。なお、リフィーディングシンドロームのモデルラットは確立されていないため、その前段階としての基礎研究である。

他方、再給餌初期の体組成は短期絶食後ではたんぱくを、長期絶食後では脂肪を回復させる機構がはたらくことが報告されている<sup>38)</sup>。体組成回復パターンの違いにより、再給餌期に優先的に選択される多量栄養素源が変化するののかについても検討した。

### 2. 実験方法

#### (1) 飼料

予備飼育及び再給餌期間中、ラットに給餌した飼料の組成を Table 3-2-1 に示した。

#### (2) 動物飼育

8 週齢の Wistar 系雄性ラット(体重 250~260 g)を日本クレア(株)より購入し、1 匹ずつラット用代謝ケージに入れて飼育した。

#### (3) 実験手順

ラットを対照食で一週間予備飼育した後、短期(Short-term, n=12)又は長期(Long-term, n=12)絶食させた。絶食日数は、短期絶食群は 3 日間、長期絶食群は 8 日間とした。短期/長期絶食後、それぞれ平均体重が等しくなるように 3 群に分け、高たんぱく食(PRO, n=4)、高脂肪食(FAT, n=4)、対照食(CHO, n=4)を 8 日間再給餌した。また、解剖日の違いによる影響を排除するため、Short-term 群、Long-term 群それぞれにつき非絶食群を設けて対照群(CONT, それぞれ n=4)とした。毎日体重変化量、飲水量、飼料摂取量を測定した。絶食期、再給餌期の 24 時間尿を採尿し、ビタミン排泄量を測定した。飼育最終日にラットを断頭屠殺し、即座に解剖して大脳、心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓、精巣を摘出し、重量を測定した。肝臓を適量の大きさに切り取り、各ビタミン定量のための処理を行った。また、EDTA-2K を含む試験管に血液を採集し、全血又は遠心分離(7,000 × g, 30 分, 室温)によって得られた血漿を分析に用いた。検体が不足したため、血液成分検査には血清を用いた。

#### (4) 分析

血清中グルコース, TG, 尿素窒素, AST, ALT, クレアチニン及び尿中尿素窒素は富士ドライケム 3500i(富士フイルム株式会社)にて測定した。

尿中, 血液中, 肝臓中の B 群ビタミンの測定方法は文献 10~22 のとおりである。

#### (5) 統計処理

数値はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。短期絶食群, 長期絶食群それぞれについて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った。p 値が 0.05 未満のとき, 統計学的有意差があるものとみなした。統計解析には GraphPad Prism 5 (GraphPad Software 社)を使用した。

### 3. 結果・考察

#### (1) 飼料中の多量栄養素量が再給餌期間中の体重量, 飲水量, 摂食量に及ぼす影響

ラットの体重変化量, 飲水量, 摂食量を Fig. 3-2-1 に示した。短期絶食後, 高脂肪食を摂取したラットは再給餌 4 日目に絶食前の体重まで回復し, その後も体重増加量が他の群に比べ最大であった (Fig. 3-2-1A)。長期絶食後も短期絶食後と同様, FAT 群の体重増加量が最速最大であり, CHO 群, PRO 群の順につづいた (Fig. 3-2-1E)。絶食期間中, ラットの飲水量は徐々に減少し, 絶食 4 日目から 5 mL/d 以下となった。FAT 群, CHO 群は再給餌を開始すると飲水量が CONT 群と同程度まで増加したが, PRO 群の飲水量は約 2 倍と多飲を呈した (Fig. 3-2-1 B, F)。PRO 群の尿中尿素窒素は他群の 3 倍以上であったため (Fig. 3-2-4), 窒素の排泄のために多飲行動をとったのかもしれない。短期絶食後の摂食量は再給餌 1 日目から絶食前と同重量であった (Fig. 3-2-1C)。単位重量当たりのエネルギー量が高いため, FAT 群のエネルギー摂取量は他の 3 群に比べ 30 kcal/d 程高かった (Fig. 3-2-1D)。長期絶食後の再給餌 1 日目の摂食量は絶食前よりも 5 g 程度少なかったが, 再給餌 4 日目からは反対に過食傾向を示した (Fig. 3-2-1G)。短期絶食後の通常飼料の再給餌では過食がみられることが報告されており, 長期絶食後の再給餌では過食又は食欲減退の矛盾した報告がされている<sup>39-40)</sup>。本研究では, 短期絶食後の CHO 群の摂食量は CONT 群と同等であり, 過食は認められなかった。また, 長期絶食後は食欲が減退しているが, 再給餌 3 日以内に元に戻る事が確認された。Habold ら<sup>41)</sup>によると, 短期絶食後では再給餌後 30 分間で空腸粘膜の構造的な回復が確認され, 長期絶食後でも 3 日間の内に完全な細胞回復が起こる。そのため, Long-term 群の摂食量は再給餌 3 日目以降から増加したと思われる。

#### (2) 飼料中の多量栄養素量が再給餌後の臓器重量に及ぼす影響

再給餌後のラットの臓器重量を Fig. 3-2-2 に示した。短期, 長期絶食ともに PRO 群の腎重量は CONT 群の約 1.3 倍と高値を示した (Fig. 3-2-2D)。CHO 群の肝臓は, 長期絶食後の再給餌によって肥大した (Fig. 3-2-2E)。その他の臓器重量に有意差は認められなかった。

#### (3) 飼料中の多量栄養素量が再給餌後の血液指標に及ぼす影響

再給餌後のラットの血液生化学検査値を Fig. 3-2-3 に示した。長期絶食後, 高たんぱく食の給餌では絶食により低下した血糖値の回復が認められなかった (Fig. 3-2-3A)。8 日間の再給餌では血清 TG の回復は認められず, 短期絶食群, 長期絶食群ともに CONT 群の 1/3 程度であった (Fig. 3-2-3B)。PRO 群の血清尿素窒素濃度は他のラットの 3 倍程度に増加した (Fig. 3-2-3C)。長期絶食後, 高たん

ばく食を給餌したラットの血清クレアチニン濃度は CONT 群よりも低値を示した (Fig. 3-2-3F).

#### (4) 飼料中の多量栄養素量が再給餌期間中の B 群ビタミン代謝に及ぼす影響

短期/長期絶食後の再給餌がビタミン B<sub>1</sub> 代謝に及ぼす影響を Fig. 3-2-5 に示した. 長期絶食後の尿中排泄量は再給餌 3 日目までほとんど変化しなかったが, 8 日目には絶食前と同程度まで増加した (Fig. 3-2-5C). 余剰分のビタミンは尿中へ排泄されるため, 尿中排泄量は体内要求量を反映している. すなわち, ビタミンを摂取しているのにも関わらず尿中への排泄が認められなかった再給餌 1~3 日目は体内への取り込みが促進されており, 8 日目には体内貯蔵量が通常状態まで回復したため尿中排泄量が増加したと考察した. 血中, 肝臓中ビタミン B<sub>1</sub> 量は PRO 群において高値を示したが, CONT 群の値が低いための誤差であろう.

短期/長期絶食後の再給餌がビタミン B<sub>2</sub> 代謝に及ぼす影響を Fig. 3-2-6 に示した. ビタミン B<sub>2</sub> もビタミン B<sub>1</sub> と同様, 再給餌 5 日目以降から尿中への排泄が通常時と等しくなった. 長期絶食の CONT 群の血中ビタミン B<sub>2</sub> 量は基準範囲内ではあるが低値を示した. 肝臓中ビタミン B<sub>2</sub> 量に有意差は認められなかった.

短期/長期絶食後の再給餌がビタミン B<sub>6</sub> 代謝に及ぼす影響を Fig. 3-2-7 に示した. ビタミン B<sub>6</sub> はアミノ酸代謝に関与しているため, 摂取たんぱく質量当たりで必要量が算出されている. PRO 群の尿中 4-PIC 排泄量は他群に比して少なく, 絶食後の再給餌においてもたんぱく代謝亢進時のビタミン B<sub>6</sub> 必要量増大が証明された. 長期絶食後, 対照食を給餌したラットの血漿中ビタミン B<sub>6</sub> 濃度は CONT 群よりも高かったが, 原因は不明である. PRO 群の肝臓中ビタミン B<sub>6</sub> 量は他群の 1.5 倍程度であった. これは, 肝臓でのたんぱく代謝の亢進を示していると考えられる.

短期/長期絶食後の再給餌がビタミン B<sub>12</sub> 代謝に及ぼす影響を Fig. 3-2-8 に示した. ヒトにおいて, 尿中ビタミン B<sub>12</sub> は濃度が一定であるため排泄量は尿量と正相関する<sup>42)</sup>. ラットについては証明されていないが, 絶食期間中の尿中ビタミン B<sub>12</sub> 排泄量の減少は飲水量減少に伴う尿量の減少によるものかもしれない. しかしながら, 多飲多尿を呈した PRO 群の尿中ビタミン B<sub>12</sub> 排泄量は他群と同程度であった. FAT 群の血漿中ビタミン B<sub>12</sub> は他群の約 1.3 倍であった. ビタミン B<sub>12</sub> は核酸やメチオニン合成によるたんぱくの合成に関与しているため, 高脂肪食の再給餌による細胞回復の亢進を示しているかもしれない.

短期/長期絶食後の再給餌がナイアシン代謝に及ぼす影響を Fig. 3-2-9 に示した. 先に述べたとおり, トリプトファン-ナイアシン転換経路により体内のナイアシン濃度は絶食中も一定に維持される. しかしながら, 短期/長期絶食後の高たんぱく食摂取, 長期絶食後の対照食摂取は肝臓中のニコチンアミド濃度を低下させた. これはエネルギー代謝亢進によりナイアシン貯蔵量が減少したことを表しているかもしれない.

短期/長期絶食後の再給餌がパントテン酸代謝に及ぼす影響を Fig. 3-2-10 に示した. 尿中排泄量は FAT 群が最小であり, 絶食後の再給餌においても脂質代謝亢進時のパントテン酸必要量の増大が確認された. CONT 群の血漿パントテン酸は基準値よりも高濃度であったため, 他群との間に有意差が認められた. 原因は不明である.

短期/長期絶食後の再給餌が葉酸代謝に及ぼす影響を Fig. 3-2-11 に示した. 長期絶食後の高たんぱく食の給餌により肝臓中葉酸量が減少した. 葉酸もまたビタミン B<sub>12</sub> と同様, 核酸やたんぱくの合成に関与している.

短期/長期絶食後の再給餌がビオチン代謝に及ぼす影響を Fig. 3-2-12 に示した。尿中排泄量に試験群間の差は認められなかった。ビオチンはカルボキシル化反応を触媒する酵素の補酵素である。また、血中ビオチン濃度は血中尿素窒素と相関する。CONT 群に比して、長期絶食後の PRO 群と CHO 群は血漿中ビオチン濃度が低かったが正常範囲内であり、肝臓中濃度に差が認められなかったことから測定誤差である可能性もある。

#### 4. 小括

再給餌期間中の飼料中多量栄養素含量の違いが短期/長期絶食からの回復と B 群ビタミン代謝に及ぼす影響を検討した。短期/長期絶食からの体重回復は FAT 群が最速最大であった。絶食期間中、ラットの飲水量は徐々に減少したが、再給餌により回復又は PRO 群において増加した。飼料は短期絶食後では再給餌 1 日目から絶食前と同程度摂取した。長期絶食後は食欲の減退が認められたが、再給餌 3 日間以内に回復した。PRO 群の腎重量は増大しており、多飲多尿を呈したことからも腎機能の低下が疑われる。FAT 群の臓器重量、血液検査値は試験群間で最も CONT 群に近い値を示したため、絶食後の再給餌には高脂肪食が有効であることが示唆された。

また、再給餌期間中に高たんぱく食を与えたラットの尿中 4-PIC 排泄量は他群よりも低く、高脂肪食を与えたラットの尿中パントテン酸排泄量も低い傾向を示したことより、ビタミン代謝は絶食前と同様のパターンであることが確認された。

Table 3-2-1. Composition of the diet

	CONT/CHO	PRO	FAT
	(%)		
Vitamin-free milk casein	20.0	60.0	20.0
L-methionine	0.2	0.6	0.2
Gelatinized cornstarch	46.9	19.9	30.2
Sucrose	23.4	10.0	15.1
Corn oil	5.0	5.0	30.0
Mineral mixture (AIN-93-G)	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93)	1.0	1.0	1.0
Energy value (kcal / g diet)	3.8	3.9	5.2

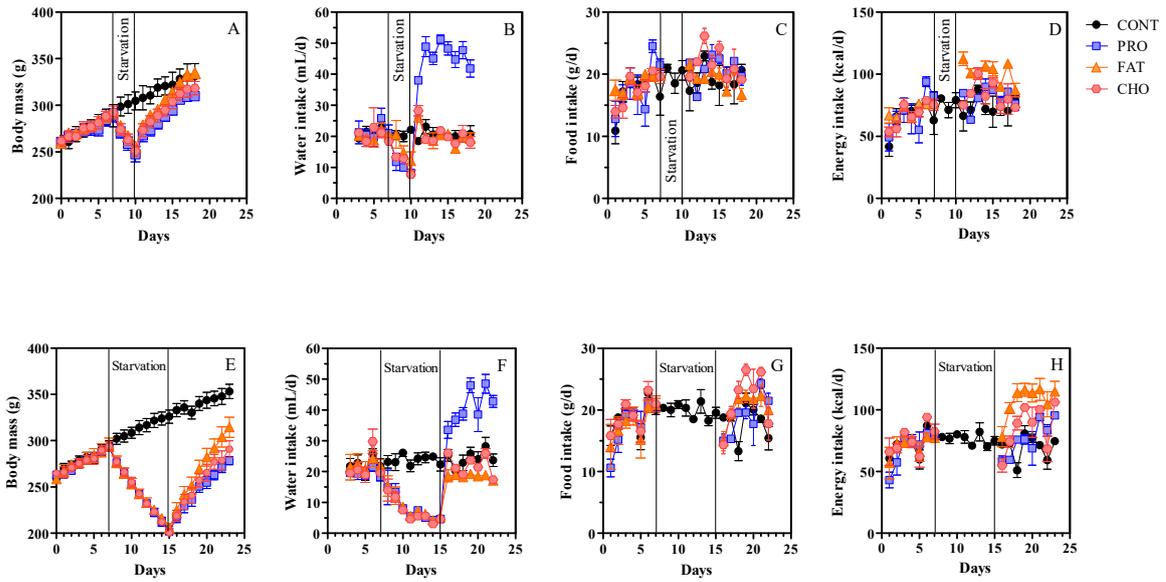


Fig. 3-2-1 Effect of macronutrient refeeding on body mass (A, E), water intake (B, F), food intake (C, G) and energy intake (D, H). Refeeding after short-term starvation (A-D) or long-term starvation (E-H). CONT, non-starved rat.

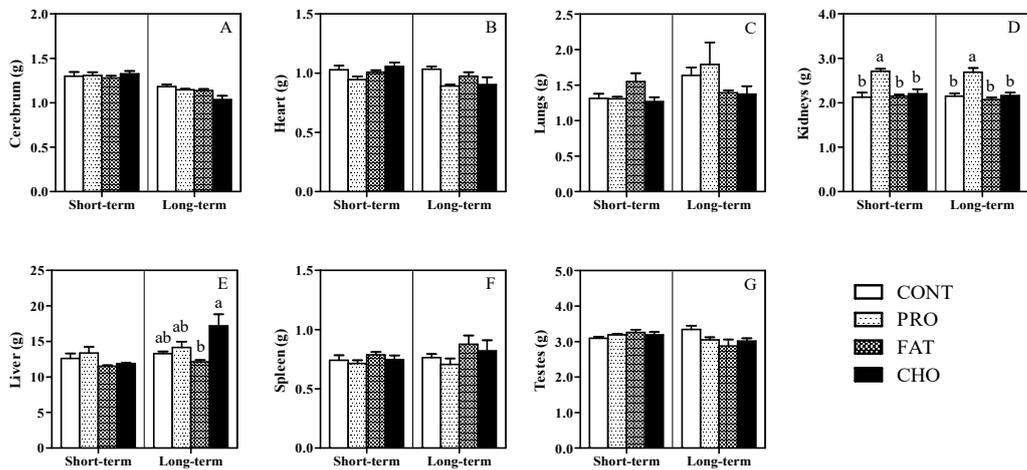


Fig. 3-2-2 Fresh organ mass of starved-refed rat. Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

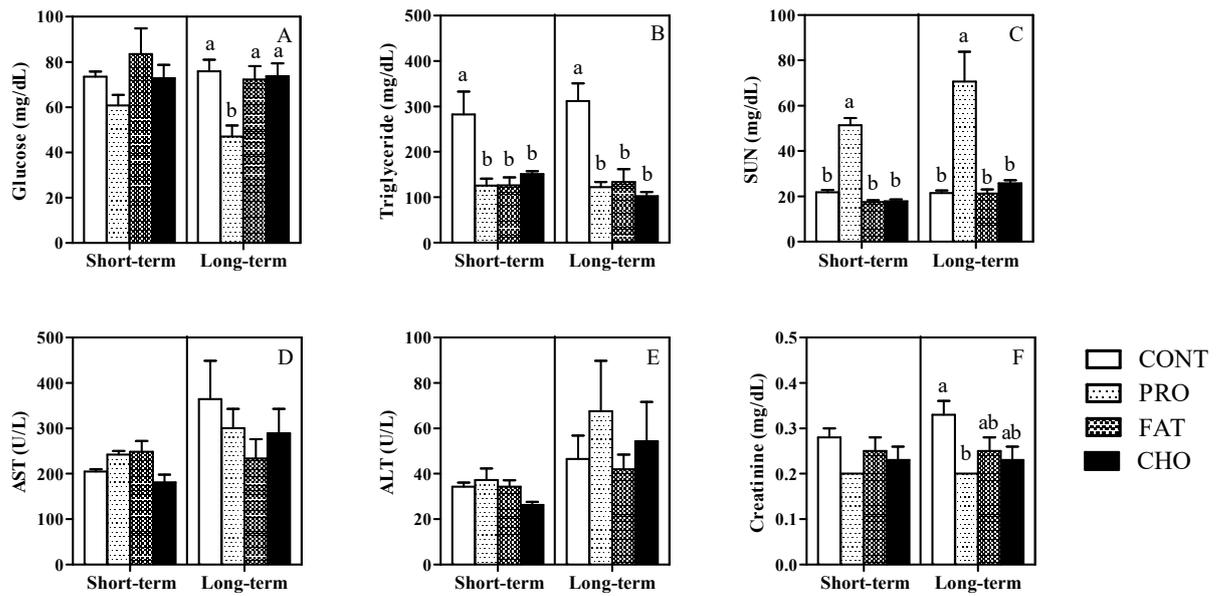


Fig. 3-2-3 Blood parameters of starved-refed rat.

Blood serum glucose (A), triglyceride (B), urea nitrogen (C), AST (D), ALT (E) and creatinine (F).

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

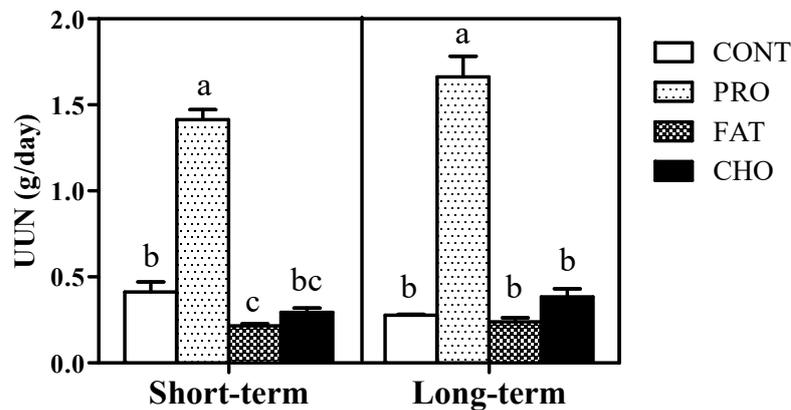


Fig. 3-2-4 Urea nitrogen in urine of starved-refed rat.

Values within the graph that do not share the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

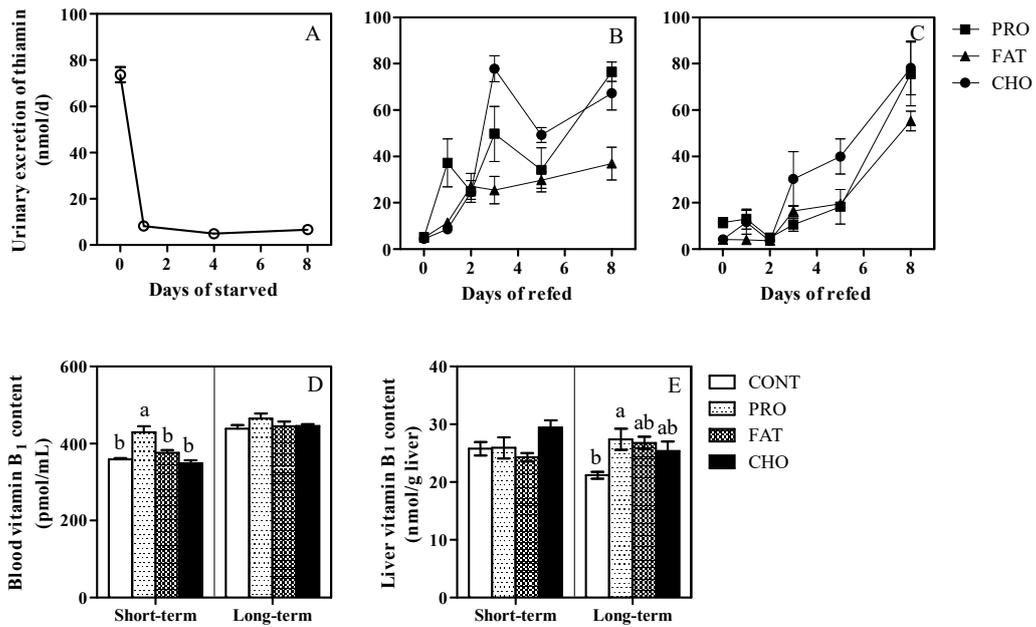


Fig. 3-2-5 Effect of macronutrient refeeding after short- and long-term starvation on vitamin B<sub>1</sub> content in urine (A-C), blood (D) and liver (E).

Urinary excretion of thiamin during starvation (A), refeeding after short-term (B) and long-term (C) starvation.

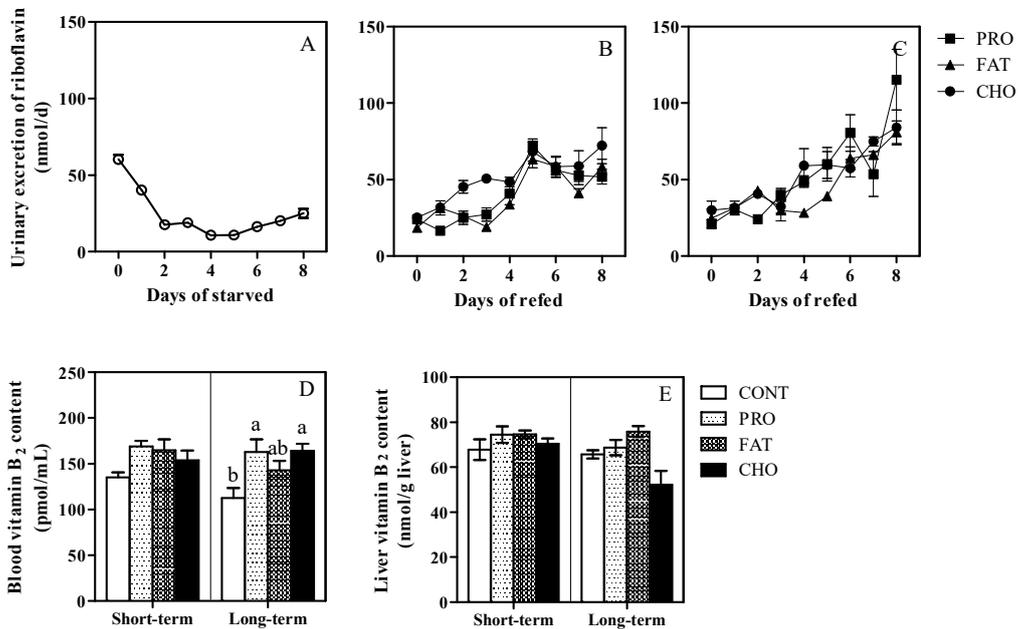


Fig. 3-2-6 Effect of macronutrient refeeding after short- and long-term starvation on vitamin B<sub>2</sub> content in urine (A-C), blood (D) and liver (E).

Urinary excretion of riboflavin during starvation (A), refeeding after short-term (B) and long-term (C) starvation.

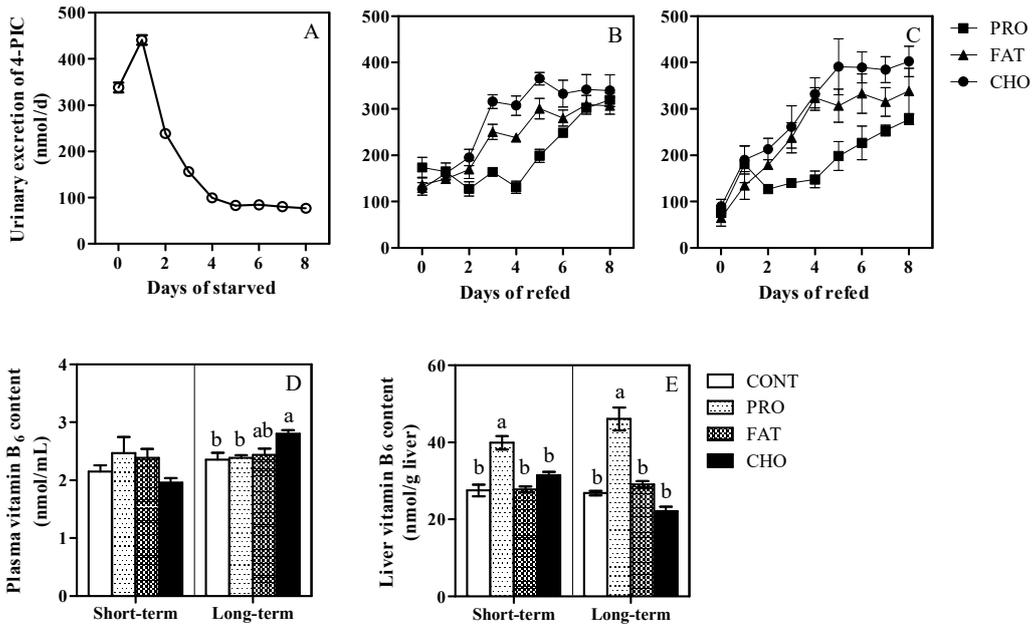


Fig. 3-2-7 Effect of macronutrient refeeding after short- and long-term starvation on vitamin B<sub>6</sub> content in urine (A-C), blood (D) and liver (E).

Urinary excretion of 4-PIC during starvation (A), refeeding after short-term (B) and long-term (C) starvation.

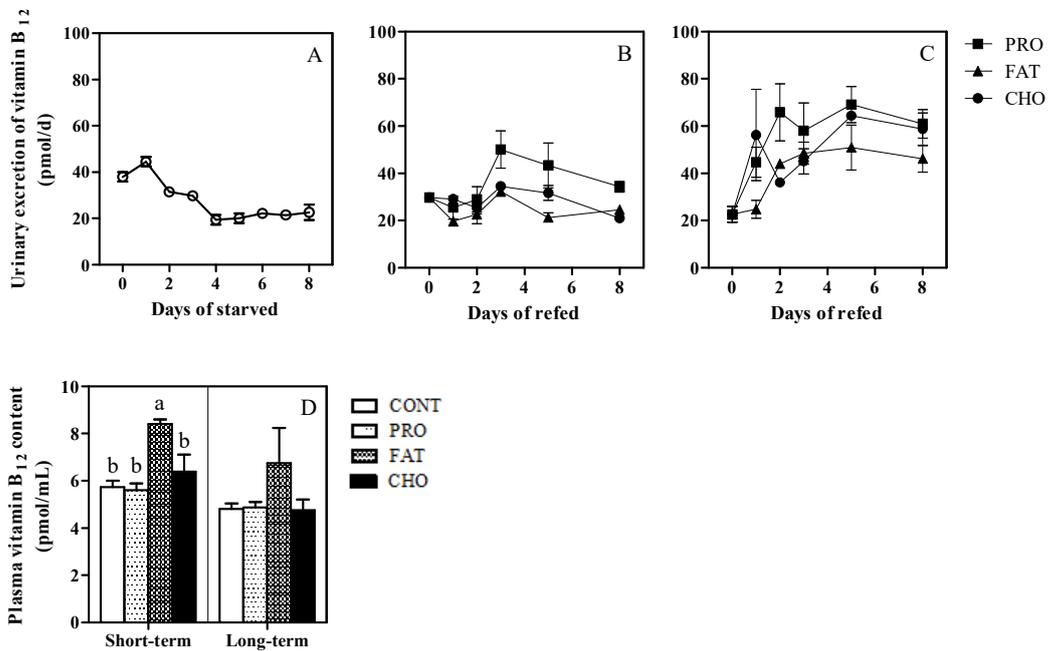


Fig. 3-2-8 Effect of macronutrient refeeding after short- and long-term starvation on vitamin B<sub>12</sub> content in urine (A-C) and blood (D).

Urinary excretion of vitamin B<sub>12</sub> during starvation (A), refeeding after short-term (B) and long-term (C) starvation.

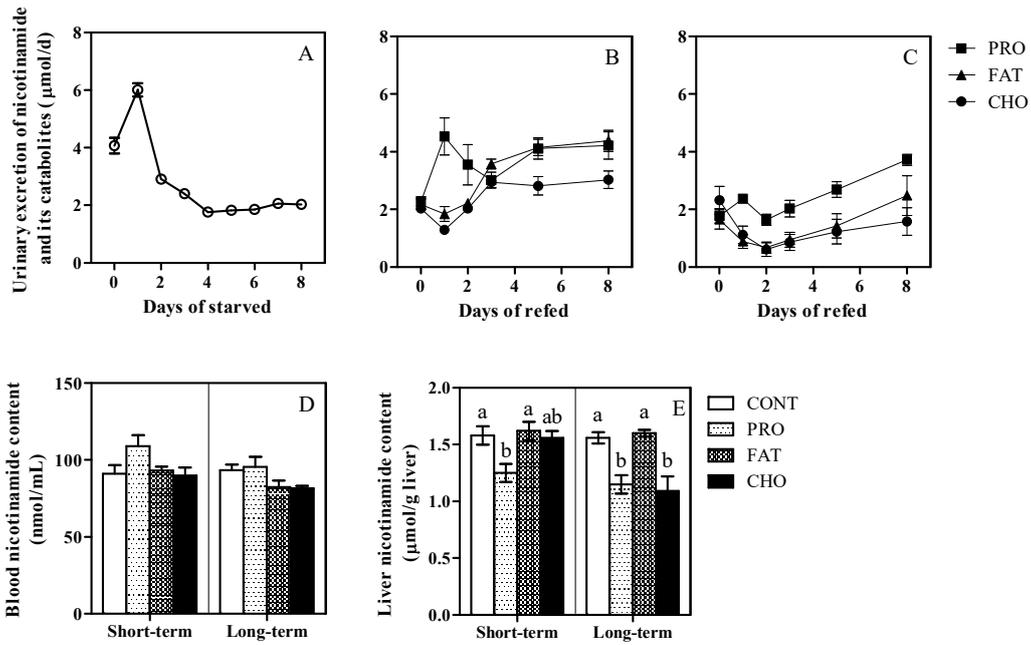


Fig. 3-2-9 Effect of macronutrient refeeding after short- and long-term starvation on niacin content in urine (A-C), blood (D) and liver (E).

Urinary excretion of nicotinamide and its catabolites during starvation (A), refeeding after short-term (B) and long-term (C) starvation.

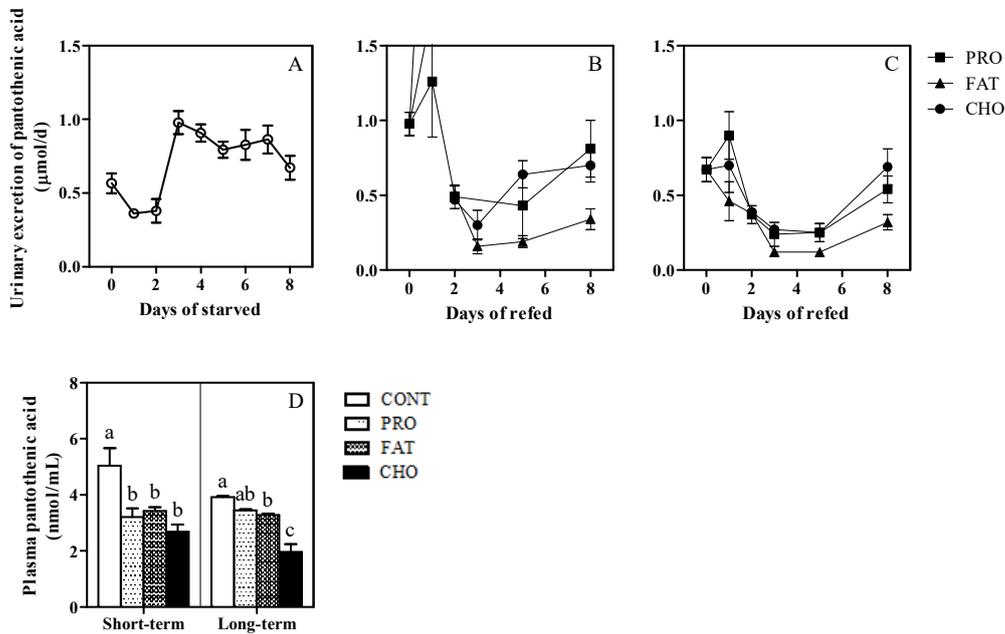


Fig. 3-2-10 Effect of macronutrient refeeding after short- and long-term starvation on pantothenic acid content in urine (A-C) and blood (D).

Urinary excretion of pantothenic acid during starvation (A), refeeding after short-term (B) and long-term (C) starvation.

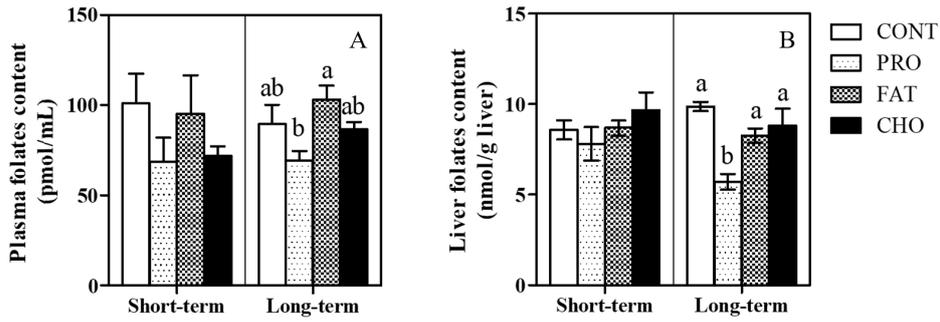


Fig. 3-2-11 Effect of macronutrient refeeding after short- and long-term starvation on folates content in blood (A) and liver (B).

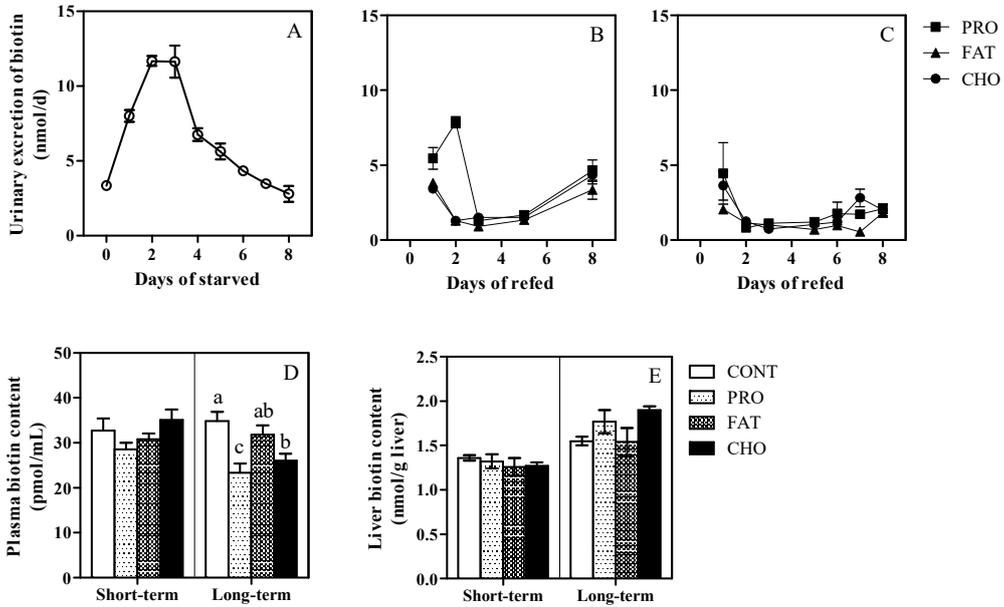


Fig. 3-2-12 Effect of macronutrient refeeding after short- and long-term starvation on biotin content in urine (A-C), blood (D) and liver (E).

Urinary excretion of biotin during starvation (A), refeeding after short-term (B) and long-term (C) starvation.

### 第三節 高脂肪食の有効性評価

#### 1. 序論

本章第二節の研究において、再給餌飼料中の多量栄養素量が絶食からの回復に及ぼす影響について検討した結果、高脂肪食の有効性が示唆された。通常、成熟ラットはエネルギー比で 30～35% たんぱく質、45～50% 脂質、15～20% 糖質を自己選択しているが<sup>43)</sup>、この比率は絶食や食餌制限に加え、妊娠、授乳、エネルギー消費の増加等の身体状態によって変化する<sup>44-46)</sup>。絶食後のラットにおける多量栄養素の自己選択パターン及び食餌摂取パターンがどのような因子によって影響されるのかを調べた研究がいくつかあり<sup>46-48)</sup>、絶食-再給餌ラットでは再給餌期の脂質摂取量が増加することが報告されているが、これは脂質のもつ栄養特性ではなく高エネルギーであることに起因していることが示された<sup>49)</sup>。しかしながら、先の研究では飼料のエネルギー量を揃えるために重量比で 50.4%のセルロースが配合された。ラットは水分量の多い飼料を好むため<sup>50-51)</sup>、セルロースの乾燥したテクスチャーがラットの嗜好性に影響した可能性がある。そこで、本研究では高脂肪食の摂取重量を制限することにより、エネルギー量による影響を確認することを目的とし、体重増加率の最大である再給餌 1 日目及び体重が絶食前の値まで回復する再給餌 7 日目のラットの生体指標について検討した。また、正常なラットに高脂肪食を給餌した場合には、脂肪組織からレプチンが分泌され、摂食抑制が起こることにより体重が増大しないようコントロールされることが報告されている<sup>52)</sup>。絶食後にはこの機構が変動することを確認するため、非絶食-高脂肪食給餌ラットを同時に飼育した。すべての群において、体組成の変化を検討するために体重量、臓器重量に加えて脂肪重量、筋肉重量と肝組成を測定した。

#### 2. 実験方法

##### (1) 飼料

Table 3-2-1 に示した対照食(CHO)、高脂肪食(FAT)を用いた。

##### (2) 動物飼育

7 週齢の Wistar 系雄性ラット(体重 200～220 g)を日本クレア(株)より購入し、1 匹ずつラット用代謝ケージに入れて飼育した。

##### (3) 実験手順

ラットに対照食を 5 日間給餌した後、実験を開始した。体重 225 g 前後のラットを 3 日間絶食させ、以下の 3 群に分類した：Re-CHO 群(n=8)、Re-PF 群(Pair-fed, n=8)、Re-FAT 群(n=8)。Re-CHO 群と Re-FAT 群はそれぞれ対照食と高脂肪食を自由摂取させ、Re-PF 群は Re-CHO 群と同エネルギーの高脂肪食を給餌した。また、非絶食ラットに高脂肪食を給餌した(FAT, n=8)。各群を均等に二分し、再給餌 1 日目及び 7 日目に断頭屠殺した。即座に解剖して臓器(心臓、腎臓、肝臓)、脂肪(白色脂肪組織、褐色脂肪組織、皮下脂肪)、筋肉(ヒラメ筋、腓腹筋)の重量を測定した。また、ラットの血液を EDTA-2K を含む試験管に採集し、遠心分離(7,000 × g, 30 分, 室温)によって得られた血漿を分析に用いた。

##### (4) 分析

血漿中グルコース, TG, 総コレステロール, 尿素窒素, AST, ALT は富士ドライケム 3500i(富士フイルム株式会社)にて測定した。

#### (5) 肝組成の測定

肝水分量を常圧加熱乾燥法にて測定した。すなわち, 湿重量を測定した肝臓をアルミ箱中で押しつぶし, 恒量(0.001g 単位)となるまで 100°C で水分を蒸発させた。肝脂肪量を Folch 法にて測定した。すなわち, 肝臓 1g に対して 1 mL の超純水を加え, Potter-Elvehjem ガラスホモジナイザーでホモゲナイズし, クロロホルム-メタノール(2:1, v/v)溶液 5 mL を加えて脂肪抽出した。0.5% NaCl 溶液を 1 mL 加えて塩析し, 遠心分離(7,000 × g, 20 分間, 室温)した水層(上層)を別のガラス試験管に移した。水層に 2 倍量のクロロホルム-メタノール溶液を加えて再抽出し, 遠心分離後のクロロホルム層(下層)を先のクロロホルム層とあわせて試料中の脂肪量を測定キット(テストワーク)を用いて測定した。肝グリコーゲン量をフェノール-硫酸法にて測定した。すなわち, 肝臓 0.1 g に対して 1 mL の 30% KOH 溶液を加えて煮沸加温抽出し, 氷中で 95%エタノール 1 mL を加えて試料中のグリコーゲンを沈殿させた。遠心分離(800 × g, 20 分間, 4°C)後の上清を取り除き, 沈殿を 1 mL の超純水に溶解させてグリコーゲン原液とした。マイクロプレートにグリコーゲン標準, グリコーゲン原液を 40 μL 分注し, 等量の 5%フェノール溶液, 5 倍量の濃硫酸を加えて 492 nm の波長における吸光度を測定した。また, 凍結切片を作製して HE 染色及びオイルレッド O 染色を行った。

#### (6) 統計処理

数値はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。試験群内(再給餌 1 日目, 再給餌 7 日目)の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った。また, 各群の値を追加飼育したラット(対照群, 3 日間絶食群)の値と比較した(Dunnnett の多重比較検定)。p 値が 0.05 未満のとき, 統計学的有意差があるものとみなした。統計解析には GraphPad Prism 5(GraphPad Software 社)を使用した。

### 3. 結果・考察

#### (1) 体重変化量及びエネルギー摂取量

ラットの体重変化量, エネルギー摂取量及び飼料効率を Fig. 3-3-1 に示した。再給餌 1 日目の体重増加量は FAT 群が最大であった(Fig. 3-3-1A)。また, 再給餌期間中のエネルギー摂取量は一週間を通じて Re-FAT 群が最大であった。先行研究(本章第二節)から, エネルギー量が等しくなるような重量を算出して給餌しているため, Re-CHO 群と Re-PF 群のエネルギー摂取量に差は認められなかった。それにも関わらず, 再給餌期間中の Re-PF 群の総体重増加量は 60 g であり, Re-CHO 群よりも 13 g 少なかった。単位エネルギー摂取量当たりの体重増加量をエネルギー効率として求めた(Fig. 3-3-1C)。再給餌期間中のエネルギー効率は通常時よりも高く, 再給餌 1 日目には Re-CHO 群で 4 倍, Re-FAT 群で 3 倍の値を示した。なお, 非絶食ラットに高脂肪食を給餌した場合, 体重増加量とエネルギー摂取量に変動は認められなかった。

#### (2) 体組成

飼育最終日のラットの体重に有意差が認められたため, 体重 1 kg 当たりの重量に補正した臓器, 脂肪, 筋肉量を Table 3-3-1 に示した。非絶食ラットに高脂肪食を給餌すると, 1 日目から肝臓重量

比の減少と白色脂肪組織の増加が認められ、さらに一週間給餌すると腎臓重量比の減少が認められた。再給餌1日後のRe-CHO群の心臓重量比はCONT群よりも1割程低く、肝臓重量比は2割程高かった。Re-PF群は再給餌により肝臓重量比が増加したが、CONT群と同じ程には回復しなかった。腎周囲脂肪の重量比は再給餌1日では変化しないが、一週間後には増加した。再給餌7日目のRe-FAT群の腎周囲脂肪重量比はCONT群よりも35%程高く、内臓脂肪の蓄積が認められた。筋肉重量は絶食や再給餌、飼料組成の変化による影響を受けなかったため、体重量補正を行うと有意差が生じた。

### (3) 肝組成

肝臓中の水分量、グリコーゲン量、脂肪量を Table 3-3-2 に示した。CONT群の肝水分率は69.7%、肝脂肪は5.2%であり、過去の報告<sup>4)</sup>とほぼ一致している。しかしながら、3日間の絶食後も肝脂肪が減少しなかったことは矛盾している。試験群の肝脂肪の割合は絶食群よりも低く、定量方法に何らかの問題があった可能性がある。一方、肝グリコーゲンは再給餌1日目に急増したが、一週間後にはCONT群と同程度に戻った。水分率に絶食-再給餌による影響は認められなかった。

Fig. 3-3-2 に HE 染色の結果を示した。再給餌1日目には細胞の委縮がみられたが、一週間で回復した。Fig. 3-3-3 にオイルレッド O 染色の結果を示した。絶食後、飼料を自由摂取させたRe-CHO群とRe-FAT群において、再給餌1日目から脂肪の蓄積が認められ、その度合いはRe-CHO群の方が大きかった。飼料摂取量を制限したRe-PF群では再給餌一週間後も肝脂肪の蓄積は認められなかった。非絶食-高脂肪食摂取ラットの肝脂肪量は、高脂肪食摂取1日目には変化しなかったが、一週間後には増加していた。これらの所見と Table 3-3-2 に示した肝脂肪量との結果は一致しておらず、再検討の必要がある。

### (4) 血液指標

ラットの血液生化学検査値を Table 3-3-3 に示した。3日間の絶食により低下した血漿グルコース濃度は再給餌1日目から元の値に回復した。再給餌1日目のRe-PF群、Re-FAT群の血漿TG及び総コレステロール濃度はCONT群に比べて低かった。摂食時間の違いによるものかもしれないが、再検証が必要と考える。再給餌1日目のRe-CHO群の血漿AST、ALTは絶食群よりも高く、対照食の摂取は高脂肪食よりも肝臓への負荷が大きいことが示唆された。

## 4. 小括

絶食後、高脂肪食の摂取により最大回復が得られた理由を検証した結果、エネルギー摂取量が高いことに起因していることが明らかとなった。再給餌1日目のRe-FAT群に体脂肪の蓄積は認められず、肝細胞はRe-CHO群よりも正常状態に近づいたため、高脂肪食の有効性が示された。しかしながら、一週間の再給餌後はRe-FAT群においてのみ内臓脂肪、皮下脂肪の蓄積が認められた。したがって、再給餌初期の適合には高脂肪食は有効であるが、その後は速やかに脂肪摂取量を適正範囲まで減らすことが絶食後の体組成回復に効果的であることが示唆された。

また、絶食ラットに高脂肪食を与えた場合の摂取エネルギー量は、非絶食ラットに与えた場合に比べて高値を示した。絶食/非絶食後の高脂肪食の摂食量の違いはセロトニン分泌量と関係しているかもしれないが、本研究では理由を解明することはできなかった。

Table 3-3-1. Body mass and relative mass of organ, fat pad and muscle in control, starved, refed and HFD fed rat

	CONT	Starved 3d	1-day feeding				7-day feeding					
			Re-CHO	Re-PF	Re-FAT	FAT	Re-CHO	Re-PF	Re-FAT	FAT		
Body mass gain (g/d)			16.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	20.7 ± 0.9 <sup>c</sup>	3.7 ± 0.6 <sup>b</sup>						
Body mass gain (g/wk)												36.0 ± 1.7 <sup>c</sup>
Final body mass (g)	240 ± 1	200 ± 3*	207 ± 2 <sup>a*</sup>	193 ± 2 <sup>b*</sup>	207 ± 2 <sup>a*</sup>	237 ± 1 <sup>c†</sup>	260 ± 2 <sup>ab**</sup>	248 ± 1 <sup>a†</sup>	263 ± 4 <sup>ab**</sup>	272 ± 5 <sup>b**</sup>		
Relative mass (g wet wt/kg body mass)												
Organ												
Heart	3.32 ± 0.08	3.45 ± 0.09	3.04 ± 0.04 <sup>#</sup>	3.42 ± 0.11	3.30 ± 0.06	3.36 ± 0.05	3.32 ± 0.08	3.15 ± 0.11	3.34 ± 0.09	3.26 ± 0.06		
Kidneys (right and left)	7.85 ± 0.11	7.75 ± 0.24	7.60 ± 0.24	7.58 ± 0.20	7.85 ± 0.24	8.23 ± 0.11	7.71 ± 0.11 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.55 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.71 ± 0.09 <sup>b**</sup>		
Liver	47.7 ± 1.6	28.8 ± 0.4*	56.4 ± 0.9 <sup>a**</sup>	34.2 ± 0.8 <sup>b**</sup>	47.6 ± 1.3 <sup>c†</sup>	38.6 ± 0.9 <sup>b**</sup>	45.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	40.3 ± 0.6 <sup>b*</sup>	38.2 ± 0.9 <sup>b*</sup>	35.9 ± 1.1 <sup>b*</sup>		
Fat pad												
WAT												
epididymal (right)	5.04 ± 0.18	3.63 ± 0.36	4.50 ± 0.47 <sup>ab</sup>	4.44 ± 0.17 <sup>a</sup>	5.05 ± 0.19 <sup>ab†</sup>	6.33 ± 0.36 <sup>b**</sup>	5.87 ± 0.41 <sup>#</sup>	6.07 ± 0.47 <sup>#</sup>	6.28 ± 0.43 <sup>#</sup>	6.28 ± 0.40 <sup>#</sup>		
perirenal (right)	5.83 ± 0.43	3.40 ± 0.29*	2.23 ± 0.34 <sup>a*</sup>	2.26 ± 0.28 <sup>a*</sup>	2.68 ± 0.28 <sup>a*</sup>	6.10 ± 0.63 <sup>b†</sup>	6.33 ± 0.59 <sup>#</sup>	6.52 ± 0.62 <sup>#</sup>	7.89 ± 0.24 <sup>**</sup>	9.33 ± 0.70 <sup>**</sup>		
BAT												
interscapular	1.26 ± 0.11	0.70 ± 0.11*	1.34 ± 0.10 <sup>b†</sup>	0.90 ± 0.03 <sup>a*</sup>	1.16 ± 0.04 <sup>ab†</sup>	1.59 ± 0.04 <sup>c**</sup>	1.39 ± 0.03 <sup>#</sup>	1.44 ± 0.19 <sup>#</sup>	1.84 ± 0.10 <sup>#</sup>	1.46 ± 0.26 <sup>#</sup>		
Subcutaneous fat												
inguinal (right)	8.35 ± 0.79	7.20 ± 0.74	5.71 ± 0.36 <sup>ab*</sup>	5.45 ± 0.55 <sup>a*</sup>	5.65 ± 0.48 <sup>ab*</sup>	8.13 ± 0.35 <sup>b</sup>	9.73 ± 1.31	9.96 ± 0.52	10.7 ± 0.1 <sup>#</sup>	8.53 ± 0.66		
Muscle												
soleus (left)	0.37 ± 0.01	0.44 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.01 <sup>#</sup>	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.01 <sup>#</sup>	0.37 ± 0.02		
gastrocnemius (left)	4.99 ± 0.36	5.76 ± 0.42	5.83 ± 0.16	6.13 ± 0.07*	5.80 ± 0.28	5.71 ± 0.12	5.42 ± 0.37	5.64 ± 0.10	5.64 ± 0.10	5.95 ± 0.09		

Values are means ± SE, n=4/group. A different superscript letter in the same row within the same duration of refeeding indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$  compared with control rat. <sup>#</sup> $p < 0.05$  compared with starved rat.

WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue

Table 3-3-2. Liver composition in control, starved, refed and HFD fed rat

	CONT	1-day feeding				7-day feeding				
		Starved 3d	Re-CHO	Re-PF	Re-FAT	FAT	Re-CHO	Re-PF	Re-FAT	FAT
Liver mass (g wet wt)	12.2 ± 0.4	5.8 ± 0.1	11.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	9.9 ± 0.3 <sup>c</sup>	9.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	11.9 ± 0.23 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.12 <sup>b</sup>	10.0 ± 0.38 <sup>b</sup>	9.8 ± 0.3 <sup>b</sup>
Water										
g/liver	8.47 ± 0.32	3.90 ± 0.07	8.03 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.57 ± 0.13 <sup>b</sup>	6.72 ± 0.21 <sup>c</sup>	6.35 ± 0.14 <sup>c</sup>	8.16 ± 0.18 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.11 <sup>b</sup>	6.73 ± 0.23 <sup>b</sup>	6.71 ± 0.13 <sup>b</sup>
(%)	(69.7 ± 0.3)	(67.9 ± 0.5)	(68.7 ± 0.1)	(69.4 ± 0.2)	(68.2 ± 0.7)	(69.4 ± 0.2)	(68.8 ± 0.3)	(66.7 ± 0.7)	(67.0 ± 0.5)	(68.9 ± 1.2)
Lipid										
g/liver	0.61 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.16 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.10 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>ab</sup>
(%)	(5.2 ± 0.2)	(4.5 ± 0.6)	(1.4 ± 0.2) <sup>*#</sup>	(0.9 ± 0.1) <sup>*#</sup>	(1.8 ± 0.2) <sup>*#</sup>	(1.6 ± 0.2) <sup>*#</sup>	(0.3 ± 0.1) <sup>a*#</sup>	(0.5 ± 0.1) <sup>ab*#</sup>	(1.0 ± 0.2) <sup>b*#</sup>	(0.6 ± 0.1) <sup>ab*#</sup>
Glycogen										
g/liver	0.33 ± 0.05	0.05 ± 0.00	0.96 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.43 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>b</sup>
(%)	(2.7 ± 0.3)	(0.1 ± 0.0) <sup>*</sup>	(8.2 ± 0.4) <sup>a*#</sup>	(8.0 ± 0.4) <sup>a*#</sup>	(5.4 ± 0.2) <sup>b*#</sup>	(1.3 ± 0.3) <sup>c</sup>	(2.9 ± 0.2) <sup>ab#</sup>	(4.3 ± 0.7) <sup>a#</sup>	(1.6 ± 0.2) <sup>b</sup>	(0.6 ± 0.1) <sup>b*</sup>

Values are means ± SE, n=4/group. A different superscript letter in the same row within the same duration of refeeding indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$  compared with control rat. # $p < 0.05$  compared with starved rat.

Table 3-3-3. Blood parameters of control, starved, refed and HFD fed rat

	CONT	1-day feeding				7-day feeding				
		Starved 3d	Re-CHO	Re-PF	Re-FAT	FAT	Re-CHO	Re-PF	Re-FAT	FAT
Glucose (mg/dL)	115 ± 2	30.8 ± 4.3*	94.3 ± 5.1 <sup>#</sup>	94.8 ± 4.3 <sup>#</sup>	129 ± 6 <sup>#</sup>	113 ± 9 <sup>#</sup>	110 ± 5 <sup>#</sup>	111 ± 7 <sup>#</sup>	118 ± 5 <sup>#</sup>	115 ± 6 <sup>#</sup>
Urea nitrogen (mg/dL)	17.9 ± 0.9	15.6 ± 1.3	19.3 ± 1.4	14.3 ± 1.2	17.1 ± 1.5	15.0 ± 1.7	20.8 ± 1.8 <sup>#</sup>	18.4 ± 0.6	16.5 ± 1.5	16.5 ± 0.5
Triglyceride (mg/dL)	171 ± 17	75.8 ± 4.6*	139 ± 54	40.5 ± 4.4*	57.3 ± 11.2*	88.8 ± 12.9	114 ± 18	190 ± 33 <sup>#</sup>	79.3 ± 19.5*	81.3 ± 13.4*
Total cholesterol (mg/dL)	93.8 ± 5.0	48.0 ± 5.4*	53.0 ± 1.7**	69.8 ± 2.4 <sup>ab*#</sup>	63.8 ± 2.5 <sup>ab*#</sup>	78.0 ± 4.8 <sup>bt</sup>	108 ± 6 <sup>at</sup>	52.8 ± 2.4 <sup>b*</sup>	69.3 ± 4.3 <sup>b*#</sup>	70.0 ± 1.9 <sup>b*#</sup>
AST (U/L)	102 ± 5	128 ± 8	179 ± 38*	151 ± 15	122 ± 15	110 ± 9	137 ± 19	110 ± 11	121 ± 12	145 ± 33
ALT (U/L)	24.0 ± 2.4	34.2 ± 6.7	62.3 ± 12.5*	57.0 ± 10.4	50.3 ± 13.6	29.0 ± 3.0	23.7 ± 2.2 <sup>a</sup>	24.3 ± 4.1 <sup>ab</sup>	29.0 ± 1.7 <sup>ab</sup>	39.0 ± 3.6 <sup>b</sup>

Values are means ± SE, n=4/group. A different superscript letter in the same row within the same duration of refeeding indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$  compared with control rat. <sup>#</sup> $p < 0.05$  compared with starved rat.

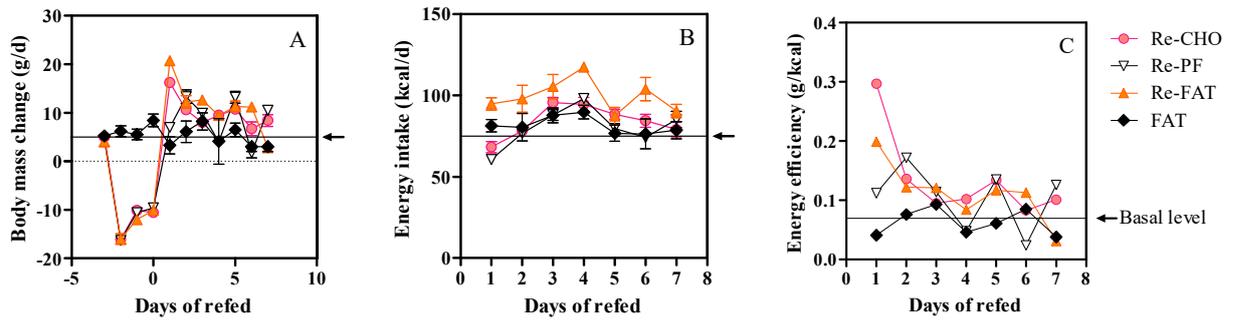


Fig. 3-3-1 Changes in body mass (A), energy intake (B) and energy efficiency (C) of starved-refed or non-starved-HFD fed rat.

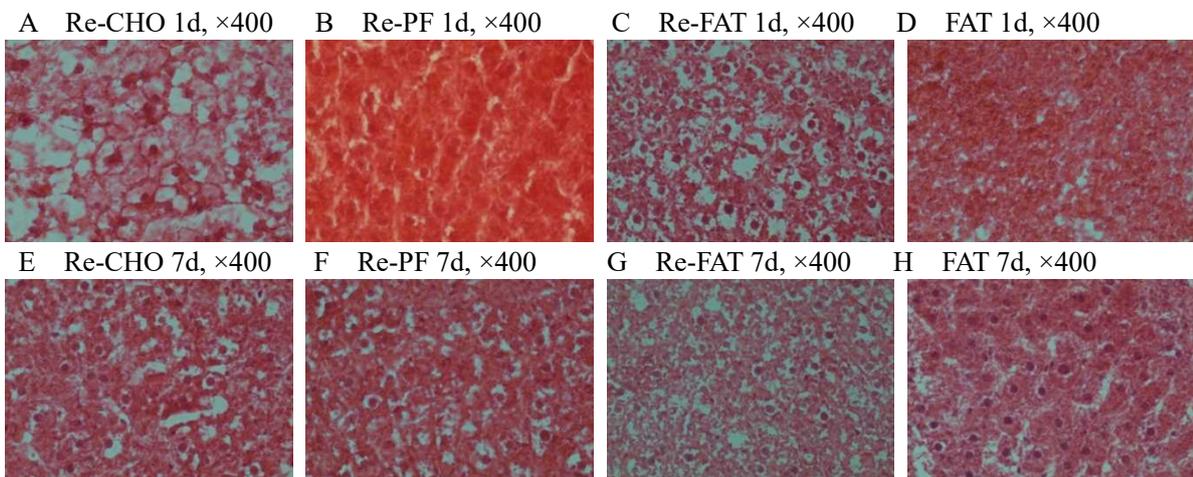


Fig. 3-3-2 HE-staining of rat liver.

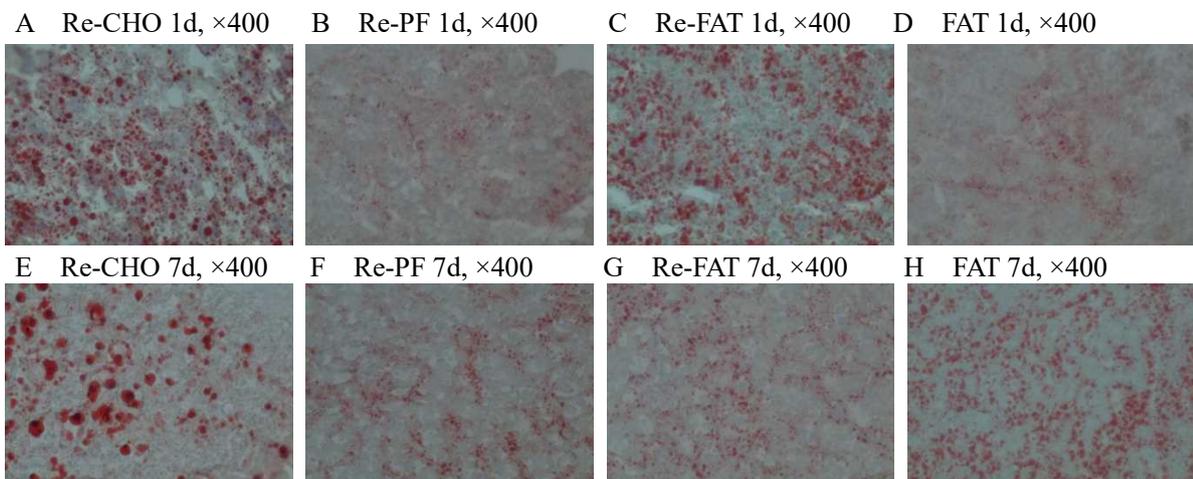


Fig. 3-3-3 Oil red O-staining of rat liver.

## まとめ

本研究では、絶食及び再給餌期間中のラットの尿中、血中、臓器中の B 群ビタミン濃度の変化を明らかにした。通常の状態では、水溶性ビタミンは、必要量を満たすまではほとんど尿中に排泄されず、必要量を超えると尿中排泄量が増大するため栄養評価の指標として用いられるが、ナイアシンやパントテン酸、ピオチンは絶食により尿中排泄量が有意に増加する期間があった。再給餌期間中の尿中ビタミン B<sub>6</sub> 排泄量は高たんぱく食を再給餌したラットで低い傾向を示し、尿中パントテン酸排泄量は高脂肪食を再給餌したラットで低い傾向を示しており、絶食により変動したかもしれないビタミン代謝は再給餌により元に戻る可能性が示された。他方、必要量のビタミンを摂取していたラットの絶食 1 日目の尿中ビタミン B<sub>2</sub> 排泄量が絶食前の約 3 倍に増加したことは、過去のヒトを対象とした研究に似た現象であり、ラットがヒトの絶食研究のモデルとして利用できることを示唆している。血中の B 群ビタミン濃度は、絶食の Phase2 では濃度を維持しているが Phase3 で低下するものが大半であるが、ビタミン B<sub>12</sub> 及びナイアシンは長期絶食によっても一定に保たれていた。臓器中の B 群ビタミン濃度は、臓器によって、また、ビタミンの種類によって、異なる挙動を示した。絶食期間中は代謝活性が著しく低下しているためか、主要エネルギー源としている栄養素(糖質、脂肪酸、アミノ酸)とその補酵素として働くビタミン消費量に比例関係がないことが証明された。このような結果を導いた要因については更なる解明が必要であるものの、本研究はラットの各種試料中の B 群ビタミン濃度の変化を現象として捉えた初めての研究である。

これまで、絶食及び再給餌期間中の B 群ビタミン濃度を網羅的に調べた研究は見当たらず、本研究結果は基礎データとして有用であると考えている。実験動物にラットを用いる研究は多々実施されているが、絶食及び再給餌期間中の飼育条件を変更した場合において、本研究で得られた結果と比較することにより、それらがビタミン代謝に与える影響を評価できるようになるだろう。

さらに、本研究では、絶食からの再摂食に供する栄養組成(多量栄養素)についても検証した。その結果、高たんぱく食は禁忌であることが示唆された。また、高脂肪食は単位重量当たりの熱量が高く少量でエネルギーを摂取でき、血液検査値にも悪影響を及ぼさなかったことから、低栄養からの回復に有効である可能性が示された。ただし、体重回復後に通常食へ切り替えることが必要であり、体重、血圧、電解質濃度等の指標を都度評価しタイミングを図ることが求められる。また、本研究はラットを対象にしたものであり、さらに、固形食を経口摂取させたものであるため、人へ適用するには更なる研究が必要である。今後、低栄養者に適した食事療法が解明され、より良い治療につながることを期待する。

## 引用文献

1. Cherel Y, Le Maho Y: Five months of fasting in king penguin chicks: Body mass loss and fuel metabolism. *Am J Physiol* 249; R387-92, 1985
2. Le Maho Y, Delclitte P, Chatonnet J: Thermoregulation in fasting emperor penguins under natural conditions. *Am J Physiol* 231; 913-22, 1976
3. Le Maho Y, Vu Van Kha H, Koubi H, Dewasmes G, Girard J, Ferre P, Cagnard N: Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *Am J Physiol* 41; E342-E354, 1981
4. Goodman MN, Larsen PR, Kaplan MM, Aoki TT, Young VR, Ruderman NB: Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am J Physiol* 239; E277-86, 1980
5. Cherel Y, Robin JP, Heitz A, Calgari C, Le Maho Y: Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol B* 162; 305-13, 1992
6. Koubi HE, Robin JP, Dewasmes G, Le Maho Y, Frutoso J, Minaire Y: Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides increased protein utilization. *Physiol Behav* 50; 337-43, 1991
7. Kmiec Z, Pokrywka L, Kotlarz G, Kubasik J, Szutowicz A, Mysliwski A: Effects of fasting and refeeding on serum leptin, adiponectin and free fatty acid concentrations in young and old male rats. *Gerontology* 51; 357-62, 2005
8. Li RY, Zhang QH, Liu Z, Qiao J, Zhao SX, Shao L, Xiao HS, Chen JL, Chen MD, Song HD: Effect of short-term and long-term fasting on transcriptional regulation of metabolic genes in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 344; 562-70, 2006
9. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123; 1939-51, 1993
10. 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. *食品衛生学雑誌* 45; 231-8, 2004
11. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* 258; 5623-8, 1983
12. Ohakawa H, Ohishi N, Yagi K: A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int* 4; 187-94, 1982
13. Gregory JF 3<sup>rd</sup>, Kirk JR: Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 32; 879-83, 1979
14. Rybak ME, Pfeiffer CM: Clinical analysis of vitamin B6: determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem* 333; 336-44, 2004
15. AOAC International, Official Methods of Analysis, 16<sup>th</sup> edition. (AOAC, Inc., Arlington, VA, USA) 1995

16. Watanabe F, Abe K, Katusra H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y: Biological activity of hydroxo-vitamin B12 degradation product formed during micro- wave heating. *J Agric Food Chem* 46; 5177-80, 1998
17. 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-4-pyridone-3-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 424; 23-8, 1988
18. Shibata K: Ultramicro-determination of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* 61; 599-604, 1987
19. Shibata K: High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide in rat tissue samples and blood after extraction with diethyl ether. *J Chromatogr* 422; 257-62, 1987
20. Skeggs HR, Wright LD: The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* 156; 21-6, 1944
21. Tamura T: "Microbiological assay of folates" in *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. ed by Picciano MF, Stolstad ELR, Gregory JF, III (Wiley-Liss, New York, USA) 1990
22. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y: Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* 40; 491-8, 1994
23. Fukuwatari T, Yoshida E, Takahashi K, and Shibata K: Effect of fasting on the urinary excretion of water-soluble vitamins in humans and rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 56; 19-26, 2010
24. Moriya A, Fukuwatari T, Shibata K: Nutrition parameters in Wistar rats fed on a purified diet. *Vitamins (Japan)* 83; 612-7, 2009
25. Lange DJ, Joubert CP: Assessment of nicotinic acid status of population groups. *Am J Clin Nutr* 15; 169-74, 1964
26. Consolazio CF, Johnson HL, Krywicki HJ, Wilt NF: Tryptophan-niacin interrelationships during acute fasting and caloric restriction in humans. *Am J Clin Nutr* 25; 572-5, 1972
27. Shibata K, Iwai K: Effects of fasting on the blood NAD level, and urinary excretion of 5-hydroxyndole-3-acetic acid, and nicotinamide and its metabolites in rats. *Agric Biol Chem* 52; 2287-92, 1988
28. Shibata K, Kondo T, Miki A: Increased conversion ratio of tryptophan to niacin in severe food restriction. *Biosci Biotechnol Biochem* 62; 580-3, 1998
29. Takahashi K, Okuno A, Fukuwatari T, Shibata K: Comparison of the nicotinamide catabolism among rat strains. *Biosci Biotechnol Biochem* 73; 274-9, 2009
30. Shibata K: Nutritional factors affecting the activity of liver nicotinamide methyltransferase and urinary excretion of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide in rats. *Agric Biol Chem* 50; 1489-93, 1986
31. Shibata K, Taguchi H, Iwai K: Effects of dietary protein levels on the enzyme activities involved in tryptophan-niacin metabolism in rats. *Agric Biol Chem* 52; 3165-7, 1988
32. Merrill AH Jr., Henderson JM, Wang E, McDonald BW, Millikan WJ: Metabolism of vitamin B-6 by human liver. *J Nutr* 114; 1664-74, 1984

33. Bode W, Mocking JA, van den Berg H: Influence of age and sex on vitamin B-6 vitamær distribution and on vitamin B-6 metabolizing enzymes in Wistar rats. *J Nutr* 121; 318-29, 1991
34. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okumoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimura M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, 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* 51; 319-28, 2005
35. Fukuwatari T, Shibata K: Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* 54; 223-9, 2008
36. Stanga Z, Brunner A, Leuenberger M, Grimble RF, Shenkin A, Allison SP, Lobo DN: Nutrition in clinical practice—the refeeding syndrome: illustrative cases and guidelines for prevention and treatment. *Eur J Clin Nutr* 62; 687-694, 2008
37. Mehanna HM, Moledina J, Travis J: Refeeding syndrome: what it is, and how to prevent and treat it. *BMJ* 336; 1495-8, 2008
38. Robin JP, Decrock F, Herzberg G, Mioskowski E, Le Maho Y, Bach A, Groscolas R: Restoration of body energy reserves during refeeding in rats is dependent on both the intensity of energy restriction and the metabolic status at the onset of refeeding. *J Nutr* 138; 861-1, 2008
39. Hamilton CL: Problems of refeeding after starvation in the rat. *Ann NY Acad Sci* 157; 1004-17, 1969
40. Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsche R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, Balleve O: Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr* 129; 1340-6, 1999
41. Hibold C, Chevalier C, Dunel-Erb S, Foltzer-Jourdainne C, Le Maho Y, Lignot JH: Effects of fasting and refeeding on jejuna morphology and cellular activity in rats in relation to depletion of body stores. *Scand J Gastroenterol* 39; 531-9, 2004
42. Fukuwatari T, Sugimoto E, Tsuji T, Hirose J, Fukui T, Shibata K: Urinary excretion of vitamin B12 depends on urine volume in Japanese female university students and elderly. *Nutr Res* 29; 839-45, 2009
43. Lu Z, Wang Z, Wang X, Diao B, Feng X, He F, Zou Q, Gan L: Protection from high-fat-diet- induced impaired glucose tolerance in female Sprague-Dawley rats. *Gynecol Endocrinol* 25; 464-71, 2009
44. Hunsicker KD, Mullen BJ, Martin RJ: Effect of starvation or restriction on self-selection of macronutrients in rats. *Physiol Behav* 51; 325-30, 1991
45. Thouzeau C, Le Maho Y, Larue-Achagiotis C: Refeeding in fasted rats: dietary self-selection according to metabolic status. *Physiol Behav* 58; 1051-8, 1995
46. Piquard F, Schaefer A, Haberey P, Chanez M, Peret J: The effects of dietary self-selection upon the overshoot phenomenon in starved-refed rats. *J Nutr* 109; 1035-44, 1979
47. Bligh ME, DeStefano MB, Kramlik SK, Douglass LW, Dubuc P, Castonguay TW: Adrenal modulation of the enhanced fat intake subsequent to fasting. *Physiol Behav* 48; 373-81, 1990

48. Piquard F, Schaefer A, Haberey P: Influence of fasting and protein deprivation on food self-selection in the rat. *Physiol Behav* 20; 771-8, 1978
49. Hunsicker KD, Mullen BJ, Martin RJ: Effect of starvation or restriction on self-selection of macronutrients in rats. *Physiol Behav* 51; 325-30, 1991
50. Bernardis LL, Bellinger LL: Effect of diet hydration on food and water intake, efficiency of food utilization and response to fast and realimentation in rats with dorsomedial hypothalamic hypophagia and growth retardation. *Appetite* 3; 35-52, 1982
51. Heffner TG, Hartman JA, Seiden LS: A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 13; 453-6, 1980
52. Nakatani A, Okazaki M, Sakata S: Effect of high fat diet on serum leptin level in rats. *Bull Nara Univ Educ* 50; 39-43, 2001

## 発表論文

Aya Moriya, Tsutomu Fukuwatari, Mitsue Sano and Katsumi Shibata:

Different variations of tissue B-group vitamin concentrations in short- and long-term starved rats.

*British Journal of Nutrition* 107; 52-60, 2012

Aya Moriya, Tsutomu Fukuwatari and Katsumi Shibata:

Excess Vitamin Intake before Starvation does not Affect Body ass, Organ Mass, or Blood Variables but Affects Urinary Excretion of Riboflavin in Starving Rats.

*Nutrition and Metabolic Insights* 6; 23-28, 2013

Aya Moriya, Tsutomu Fukuwatari and Katsumi Shibata:

A Suitable Diet for Recovery from Starvation Is a High-Fat Diet, but Not a High-Protein Diet, in Rats.

*Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 64; 412-424, 2018

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、終始熱心なご指導を賜りました 柴田 克己 教授(現・甲南女子大学医療栄養学部教授)に心から感謝の意を表します。時に厳しいご意見をいただき、時に優しく励ましてくださいました。また、日頃よりの確なご助言をいただき、ラットの飼育や解剖など実験技術まで丁寧にご指導いただきました滋賀県立大学大学院 福渡 努 教授に深く感謝致します。佐野光枝准教授にもご助言と励ましをいただきました。各種ビタミンの定量にご協力いただきました滋賀県立大学人間文化学部基礎栄養学研究室の皆様、お世話になりました全ての方々に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。