

# 成長期ラットのリボフラビン代謝に 及ぼす飼料タンパク質レベルの影響

奥村ミサヲ・宮崎幸恵

Effect of Dietary Protein Levels on Riboflavin  
Metabolism in Growing Rats

Misao Okumura and Sachie Miyazaki

## 緒 言

リボフラビン（以下  $B_2$  と略記）は動物の発育促進因子として重要なビタミンの一つではあるが、成長期の動物におけるタンパク質レベルと  $B_2$  の関係については Sarett らの<sup>1)</sup> ビタミン総量とタンパク質量の差による報告がみられるのみである。著者らは既報において、適量のタンパク質量でも  $B_2$  を与えないと発育停滞、 $B_2$  欠乏症状の発現、臓器中  $B_2$  の取込量の低下等がおこることを認めた。従って、 $B_2$  の利用には飼料中タンパク質量と同時に飼料中  $B_2$  量も関与するものと考え、成長期における飼料タンパク質レベルが  $B_2$  の代謝に及ぼす影響について検討し若干の知見を得たので報告する。

## 実 験 材 料

1. 供試動物：体重50 g前後（4週令）の Wistar 系純系雄ラット20匹を用いた。
2. 試薬：ビタミンフリーカゼインは和光純薬製のもの、ウシ血清アルブミン（BSA）は Sigma 社製のものを使用し、その他の一般試薬は片山化学工業製のものを使用した。なお、遊離の  $B_2$ （FR）は市販のものを再結晶して得られた純粋のものを使用し、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）は展開溶媒として n-ブタノール：酢酸：水（v/v/v, 4:1:5）の上層を使用するペーパークロマトグラフィーにより精製して用いた。

### 3. 飼料

精製飼料は Harper らの<sup>3)</sup> 方法に準じて調製した。すなわち表1に示すごとく、22%のカゼインを対照として過不足のカゼインをコンスターチで置き換え低タンパク質飼料（8%）

表1 飼料組成 (%)

成分	低タンパク質飼料	対照飼料	B <sub>2</sub> 欠乏飼料	高タンパク質飼料
カゼイン (ビタミンフリー)	8.0	22.0	22.0	40.0
ミネラル混合物	5.0	5.0	5.0	5.0
ビタミン混合物 (水溶性)	0.25 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.25 <sup>a</sup>
ビタミン混合物 (脂溶性)	0.5	0.5	0.5	0.5
コーンオイル	4.5	4.5	4.5	4.5
コーンスターチ	81.597	67.597	67.597	49.597
塩化コリン	0.15	0.15	0.15	0.15
マンガン	0.003	0.003	0.003	0.003
	100.000	100.000	100.000	100.000

a : リボフラビン 0.5mg/100g 飼料, b : リボフラビン無添加

高タンパク質飼料 (40%) とし, 対照より B<sub>2</sub> を除去したものを B<sub>2</sub> 欠乏飼料とした。

## 実験方法

### 1. 動物の飼育

上記のラット20匹を4群に分けて飼育した。温度 22±2°C, 湿度50% 前後に, 照明は14時間明, 10時間暗 (6時点灯, 20時消灯) に調節した動物室内で, 尿, 糞を別々に採取できる Immortal 型代謝ケージで27日間単飼した。体重は毎日又は隔日に測定し, 飼料投与量は体重の10~15% とし水は純水を自由に摂取させた。体重測定時に飼料の残量, 尿量を測定し, また, 尿は一週間ずつプールして凍結保存し分析に用いた。

### 2. 試料の採取

飼育28日目に断頭撲殺の後へパリナイズした遠沈管に血液を採取, 次いで肝臓, 腎臓を摘出し, 肝臓は 0°C の生理的食塩水で灌流して血液を除去した後実験に供した。

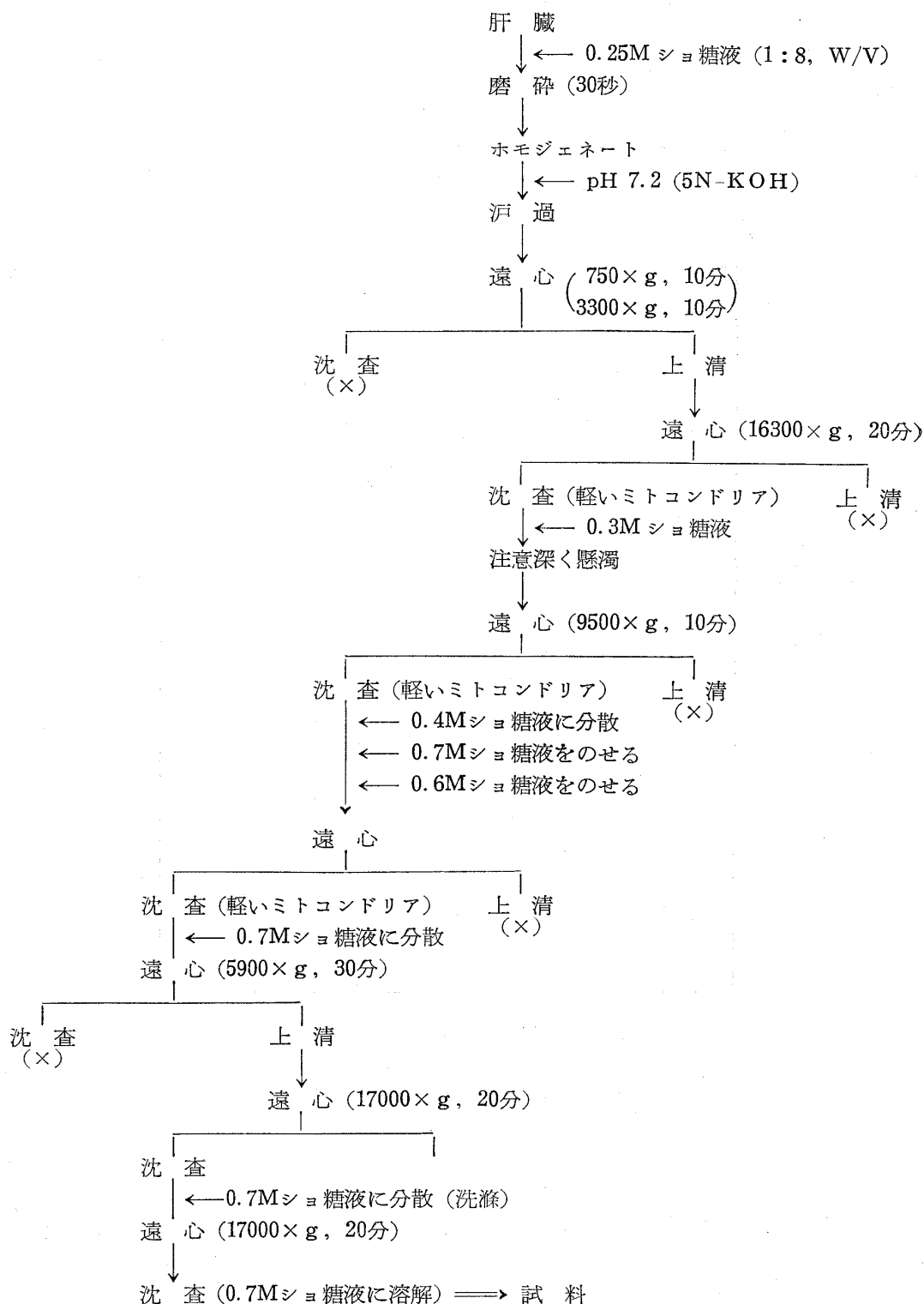
### 3. 尿, 血液, 肝臓および腎臓中 B<sub>2</sub> 量の測定

尿は蒸留水で4倍希釈したものにつき予浸を行い, 血液は8倍容の温水 (80°C) で浸出の後, 10% TCA を加えて除タンパク, 遠心して得られた上清につき, 肝臓, 腎臓は約20倍容の温水 (80°C) で浸出して得られた上清につき八木のルミフラビン蛍光法<sup>4)</sup>により B<sub>2</sub> 量を求めた。なお, B<sub>2</sub> の蛍光測定には島津微量蛍光分光光度計 (RF-510) を使用した。

### 4. 肝臓よりリソゾームの精製

B<sub>2</sub> の定量に使用した残量の肝臓を合わせて, 各群毎に8倍容の0.25M ショ糖溶液でホモジエネートを調製し図1に示すごとく, Sawant らの方法<sup>5)</sup>に準じてリソゾームを抽出, 精製した。なお, リソゾームの調製には久保田製冷凍遠心機 KR-180B を使用した。

図1 ラット肝臓よりリソゾームの精製



### 5. 肝臓ホモジェネートおよびリソゾーム中のタンパク質の定量

肝臓ホモジェネートおよびリソゾームのタンパク質量の測定には Lowry らの方法<sup>6)</sup>を用いた。標準タンパクとしてウシ血清アルブミンを用いた。

## 実験結果および考察

### 1. 成長

図2に示すごとく、 $B_2$ 欠乏飼料群で最も悪く、次いで低タンパク質飼料群の順であった。対照群と高タンパク質飼料群とでは有意な差は認められなかった。

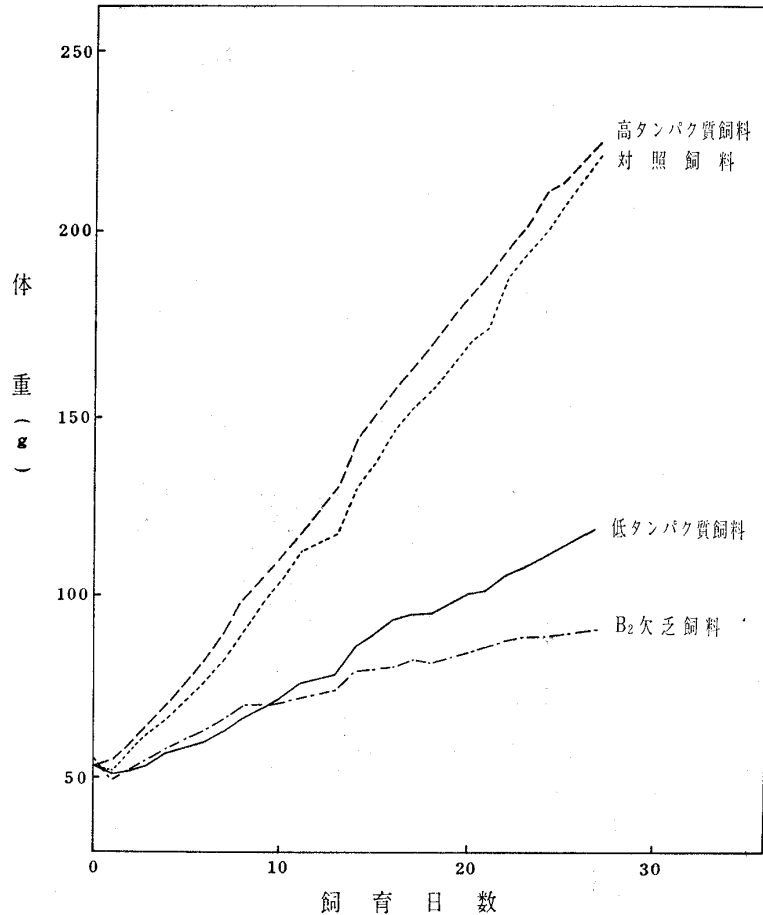


図2 実験飼料投与ラットの成長曲線

### 2. 体重の変化と摂食量

表2に示すごとく、体重増加の少ない $B_2$ 欠乏飼料群、低タンパク質飼料群では摂食量も少なく、とくに $B_2$ 欠乏飼料群では低タンパク質群と比較して摂食量に有意な差が認められないにもかかわらず体重増加量が少なかった。

### 3. 肝臓の重量、タンパク質量および $B_2$ 量

表3にみるごとく、肝臓の重量は体重に比例して対照群と高タンパク質群で有意に高かったが、タンパク質量においては4群間で有意な差は認められなかった。また、総 $B_2$ 量は組織当

表2 体重の変化と摂食量

実験群	体重 (g)		増加量 (g)	摂食量 (g/日)
	初体重	終体重		
低タンパク質飼料	53.50±0.56	120.00±3.54	61.50±0.25 <sup>A</sup>	9.75±0.22 <sup>A</sup>
対照飼料	53.50±0.90	221.67±3.66	169.00±3.38 <sup>B</sup>	14.83±0.86 <sup>B</sup>
B <sub>2</sub> 欠乏飼料	55.33±0.85	91.00±4.71	35.67±5.48 <sup>C</sup>	8.04±0.45 <sup>A</sup>
高タンパク質飼料	53.75±0.42	224.32±7.28	170.57±7.21 <sup>B</sup>	14.97±1.58 <sup>B</sup>

平均値±標準誤差 (n=5)

異符号間に有意差あり (p<0.01)

表3 肝臓の重量, タンパク質量およびリポフラビン含量

実験群	重量 (g 組織)	タンパク質量 (mg/g 組織)	総リポフラビン量	
			μg/g 組織	μg/g タンパク
低タンパク質飼料	4.43±0.70 <sup>A</sup>	238.03±21.30	17.38±0.01 <sup>A, a</sup>	75.87±4.53 <sup>a</sup>
対照飼料	9.80±1.57 <sup>B</sup>	298.98±19.60	25.17±0.75 <sup>B</sup>	89.23±2.54 <sup>a</sup>
B <sub>2</sub> 欠乏飼料	4.30±0.55 <sup>A</sup>	299.50±14.87	11.92±1.33 <sup>A, b</sup>	40.53±5.22 <sup>b</sup>
高タンパク質飼料	10.72±1.00 <sup>C</sup>	316.43±9.48	30.87±0.73 <sup>C</sup>	97.71±1.89 <sup>c</sup>

平均値±標準誤差 (n=5)

異符号間に有意差あり (大文字 p<0.01, 小文字 p<0.05)

り, タンパク当たりとも高タンパク質飼料群で有意に高く, 投与タンパク量と肝臓に蓄積される B<sub>2</sub> 量は比例した。

#### 4. 肝臓における三型 B<sub>2</sub> の動態と FAD 分解

Ragab<sup>7)</sup>らによって肝臓のリソゾーム画分に FAD 分解酵素活性が強いと報告されている

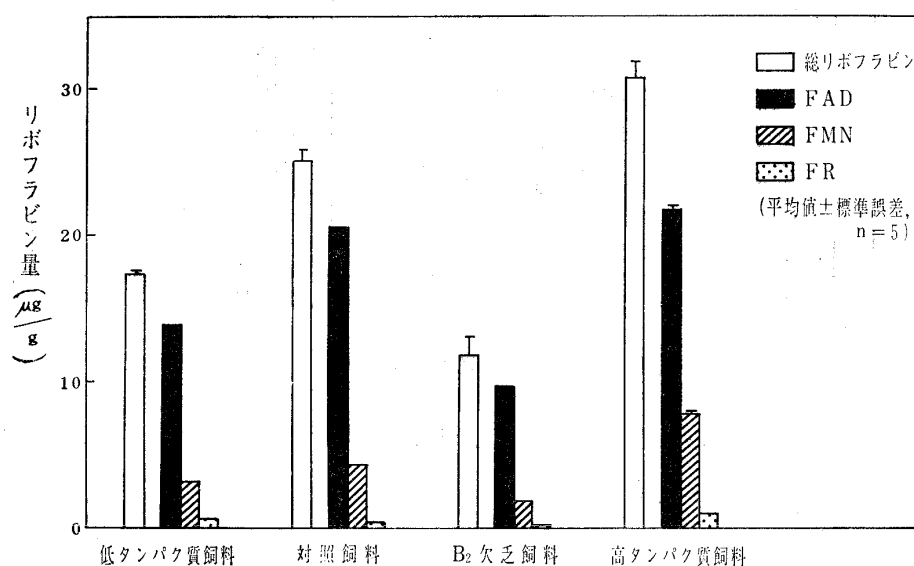


図3 肝臓のリポフラビン含量

表4 肝臓のリポフラビン三型比とリソゾームにおける FAD 分解酵素活性

実験群	三型リポフラビン (%) <sup>a</sup>			FAD 分解酵素活性 (生成 FMN / mg タンパク) (n mol / mg タンパク)
	FAD	FMN	FR	
低タンパク質飼料	70.07±2.27	26.89±1.85	3.04±0.52	124.92
対照飼料	73.05±2.07	24.06±1.96	2.89±0.36	77.88
B <sub>2</sub> 欠乏飼料	76.84±2.30	21.10±1.93	2.06±0.42	102.45
高タンパク質飼料	66.73±1.68	31.30±1.60	1.97±0.19	141.77

a : 平均値±標準誤差 (n=5)

ので、肝臓よりリソゾームを抽出、精製しその酵素活性と FAD 残存量との関係を検討した。肝臓の総 B<sub>2</sub> 量ならびに三型 B<sub>2</sub> の分布を図 3 に示し、三型 B<sub>2</sub> の動態比と肝臓リソゾームにおける FAD 分解酵素活性を表 4 に示した。図、表にみるごとく、高タンパク質飼料群、低タンパク質飼料群において FAD の分解比率が高く、FAD 分解酵素活性も高かった。対照群においては FAD の分解比率が低く、FAD 分解酵素活性も低かった。低タンパク質飼料群や高タンパク質飼料群では FAD 分解酵素活性が高いために FAD の分解率が高いものと思われる。

### 5. 腎臓の B<sub>2</sub> 含量

腎臓における総 B<sub>2</sub> 量ならびに三型 B<sub>2</sub> 量を図 4 に示した。図にみるごとく、各飼料群間に

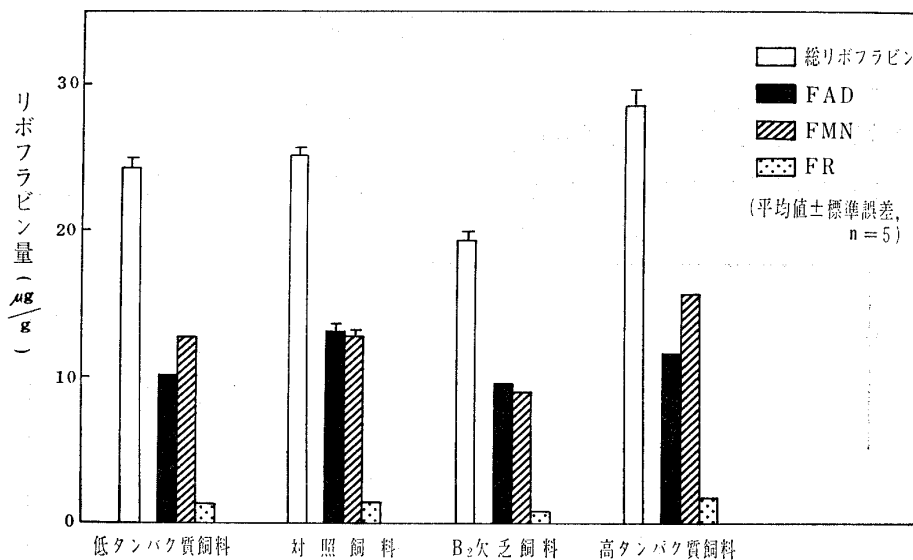


図4 腎臓のリポフラビン含量

において肝臓ほど顕著な差はみられなかった。しかし、肝臓と同様低タンパク質飼料群と高タンパク質飼料群に FAD の分解が目立った。

### 6. 血液中の B<sub>2</sub> 含量

図 5 にみるごとく、総 B<sub>2</sub> 量は B<sub>2</sub> 欠乏飼料群で最も低く、他の 3 群間では有意な差は認め

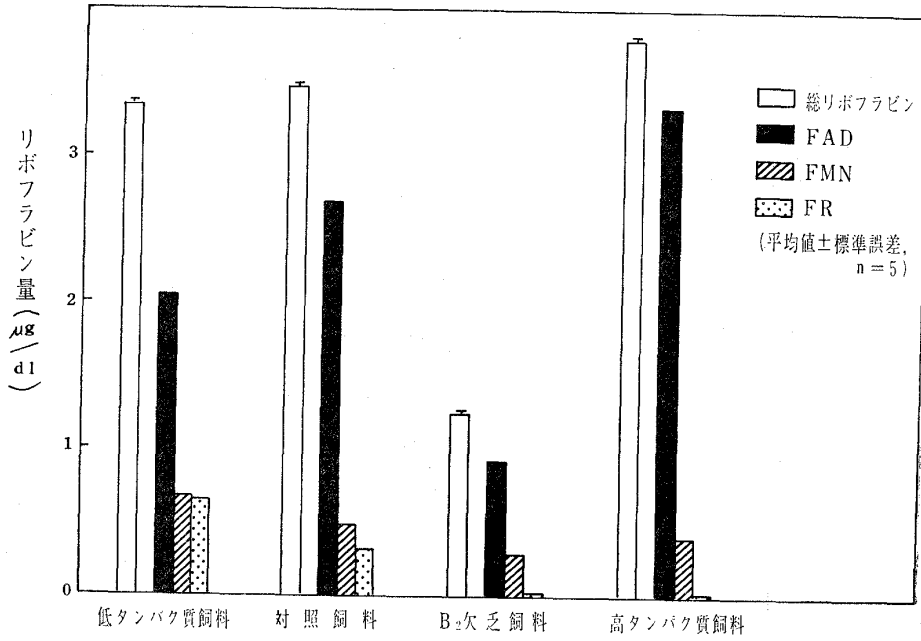


図5 血液のリポフラビン含量

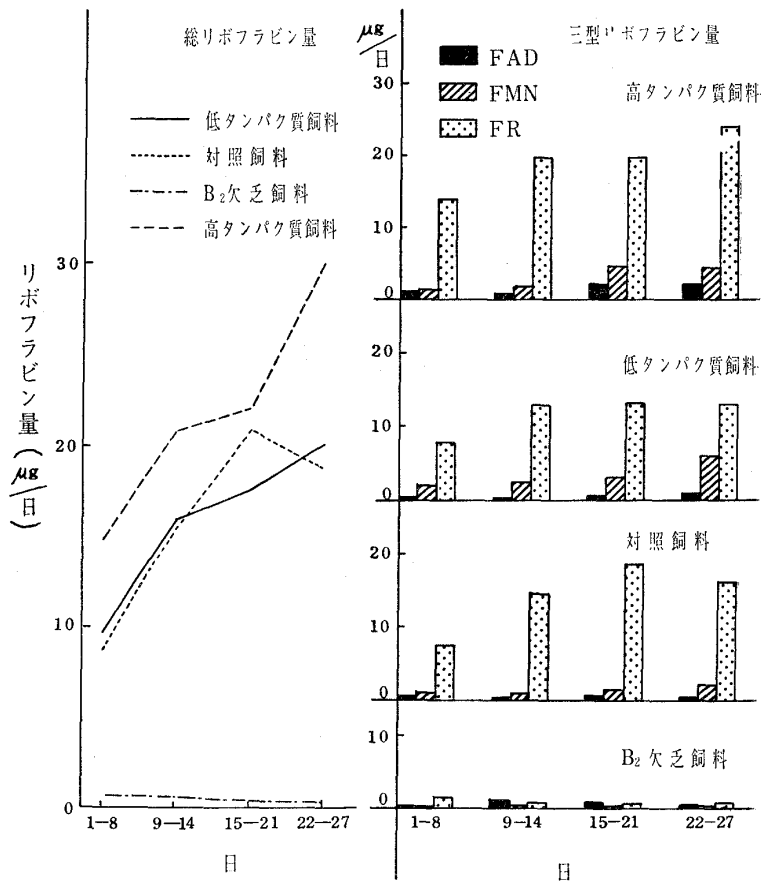


図6 尿中へのリポフラビン排泄量

られなかった。血液レベルにおいては、27日間の飼育ではタンパク質レベルの影響は表われないものと思われる。三型 B<sub>2</sub> の動態では肝臓、腎臓と逆の傾向にあり、FAD量は投与 B<sub>2</sub> 量に関係なく、投与タンパク質量に比例して高タンパク質飼料群、対照飼料群、低タンパク質飼料群、B<sub>2</sub> 欠乏飼料群の順に高い値を示した。しかし、FAD、FMN の分解は低タンパク質飼料群において著しかった。

### 7. 尿中への B<sub>2</sub> 排泄量

各飼料群の1日当りの総 B<sub>2</sub> 排泄量と三型 B<sub>2</sub> 量を図6に示した。図にみるごとく、総 B<sub>2</sub> 量は高タンパク質飼料群で最も高く、次いで対照飼料群、低タンパク質飼料群、B<sub>2</sub> 欠乏飼料群の順であり、対照飼料群が3週間目をピークに減少の傾向がみられるのに対し、低タンパク質飼料群や高タンパク質飼料群ではさらに増加の傾向がみられた。また、三型 B<sub>2</sub> 量については B<sub>2</sub> 欠乏飼料群や対照飼料群では FAD、FMN の排泄量が少ないのに対し、低タンパク質飼料群や高タンパク質飼料群では明らかに結合型 B<sub>2</sub> の排泄が多いことが伺われる。また、総 B<sub>2</sub> 量を体重 100 g 当りに換算してみると表5に示すごとくになり、やはり低タンパク質飼料群で

表5 尿中へのリボフラビン排泄量 (μg/日/100 g 体重)

実験群	週(日) 1 (1 ~ 8)	2 (9 ~ 14)	3 (15 ~ 21)	4 (22 ~ 27)
低タンパク質飼料	14.77±7.13 <sup>A</sup>	19.76±1.66 <sup>A, a</sup>	18.92±1.93 <sup>A, a</sup>	19.32±1.69 <sup>A</sup>
対 照 飼 料	7.87±1.28 <sup>B, a</sup>	11.82±1.47 <sup>A, b</sup>	11.98±0.70 <sup>A, b</sup>	9.12±0.45 <sup>B</sup>
B <sub>2</sub> 欠 乏 飼 料	1.13±0.28 <sup>B, b</sup>	0.78±0.25 <sup>B</sup>	0.44±0.09 <sup>B</sup>	0.33±0.02 <sup>C</sup>
高タンパク質飼料	14.83±3.14 <sup>A</sup>	18.84±1.21 <sup>A, a</sup>	14.65±1.51 <sup>A</sup>	16.19±2.27 <sup>A</sup>

平均値±標準誤差 (n=5)

異符号間に有意差あり (大文字 p<0.01; 小文字 p<0.05)

最も高く、次いで、高タンパク質飼料群、対照飼料群、B<sub>2</sub> 欠乏飼料群の順となり、低タンパク質飼料群や高タンパク質飼料群に B<sub>2</sub> の排泄の多いのが目立った。

### 8. 飼育27日間における B<sub>2</sub> の出納

いま、投与 B<sub>2</sub> 量が100%吸収されたものと仮定して、飼育27日間における B<sub>2</sub> の出納を計算してみると表6に示すごとくなり、B<sub>2</sub> 出納では B<sub>2</sub> 欠乏飼料群で負となり、対照飼料群で最も

表6 27日間飼育ラットのリボフラビン出納

実 験 群	摂取リボフラビン量 (μg)	尿中リボフラビン排泄量 (μg)	リボフラビン出納 (μg)	リボフラビン蓄積率 (%)
低タンパク質飼料	1315±30	415±52	900±11	69.6±1.6
対 照 飼 料	2000±116	423±39	1577±38	79.0±0.4
B <sub>2</sub> 欠 乏 飼 料	0	14±2	-14±2	—
高タンパク質飼料	2020±214	581±43	1439±85	71.2±0.5

平均値±標準誤差 (n=5)



高く、次いで、高タンパク質飼料群、低タンパク質飼料群の順に高かった。投与タンパク質量が同じでも  $B_2$  投与の有無により利用効率に大差が生じ、同じ  $B_2$  量でもタンパク質量が適量範囲をこえると利用性は減少し、とくに低タンパク質飼料群では利用性のわるさが伺われた。

Sarett<sup>1)</sup> や高橋<sup>8)</sup>らは肝臓中  $B_2$  量は投与タンパク質量に左右され、摂取  $B_2$  量には関係ないと述べているが、本実験結果より同じタンパク質量でも  $B_2$  投与の有無により肝臓、腎臓中  $B_2$  量やその利用性が変わり、さらに  $B_2$  量が同一でも飼料中タンパク質レベルが高い場合も低い場合も利用性が低下することが認められた。これらの差は  $B_2$  合成酵素および分解酵素活性の差にもとづくものと推察される。McCormick<sup>9)</sup>らは  $B_2$  欠乏ラットの肝臓ミクロゾームでは  $B_2$  投与のそれに比して FAD 分解酵素活性が高く、合成酵素活性が低いと報告しているがこの点については今後の課題にしたいと思う。

## 要 約

幼若ラットを用いてタンパク質量、 $B_2$  量の異なる4種の飼料を投与し27日間飼育した。その体重変化および尿、肝臓、腎臓、血液中の  $B_2$  量を測定した結果、以下のことが判明した。

1. 成長は高タンパク質飼料群、対照飼料群でよく、低タンパク質飼料群では著しく低下し、 $B_2$  欠乏飼料群ではさらに下まわった。
2. 肝臓中総  $B_2$  量は投与タンパク質量に比例して高タンパク質飼料群で最も高く、次いで対照飼料群、低タンパク質飼料群の順であり、 $B_2$  欠乏飼料群で最も低い値を示した。
3. 肝臓における FAD の分解と分解酵素活性は比例し、高タンパク質飼料群で最も高く、次いで低タンパク質飼料群の順であった。
4. 腎臓中総  $B_2$  量の各群間における差は肝臓ほど顕著ではなかったが、低タンパク質飼料群と高タンパク質飼料群で FAD の分解が目立った。
5. 血液中総  $B_2$  量は  $B_2$  欠乏飼料群で最も低く他の3群間では有意な差が認められなかった。
6. 尿中への総  $B_2$  排泄量は高タンパク質飼料群、低タンパク質飼料群とも日数の経過に伴って上昇し、三型  $B_2$  量においては両者とも FAD, FMN の排泄割合が高かった。
7. 飼育27日間の  $B_2$  出納と蓄積率においては低タンパク質飼料群で低く、次いで高タンパク質飼料群の順であった。

なお本報は日本家政学会第36回大会において発表したものである。

## 文 献

- 1) Sarret, H. P. and Perizweig, W. A.: J. Nutr., **25**, 173-183 (1942).
- 2) 小林ミサヲ, 小滝祥, 八木国夫: ビタミン, **36**, (3) 217-220 (1967).
- 3) Harper, A. E.: J. Nutr., **68**, 405-418 (1959).
- 4) Yagi, K.: Method in Enzymology, **17** (B), 290-296 (1971).
- 5) Sawant, P. L., Shibko, S., Kumuta, U. S. and Tappel, A. L.: Biochim. Biophys. Acta, **85**, 82-92 (1964).
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- 7) Ragab, M. H., Brightwell, R. and Tappel, A. L.: Arch. Biochem. Biophys., **123**, 179-185 (1968).
- 8) 高橋通夫: 内科宝函 **4**, (9), 743-746 (1957).
- 9) Lee, S. S. and McCormick, D. B.: J. Nutr., **113**, 2274-2279 (1983).