

ビタミンB₁₂欠乏ラットの飼育

河田 哲典¹⁾・山田 和弘²⁾・和田 政裕²⁾・田所 忠弘²⁾・前川 昭男²⁾

¹⁾岡山大学教育学部 ²⁾東京農業大学農学部

はじめに

ビタミンB₁₂ (B₁₂) は高等動物において、葉酸代謝、メチオニン代謝に関与するメチオニンシンターゼ (Met synthase) 並びにバリン、イソロイシン等のアミノ酸、プロピオン酸代謝経路の最終段階であるメチルマロニル CoA ムターゼ (MMCoA mutase) の補酵素として機能することが知られている^{1,2)}。B₁₂依存性酵素の関与する反応を図-1に示した。

現在、ビタミンB₁₂の研究は補酵素機能の酵素化学的解明、吸収及び生体内輸送機構、欠乏症の生理学的研究及びB₁₂の臨床応用等多岐にわたっているが、B₁₂研究の課題の一つとしてB₁₂の酵素化学的研究の成果と欠乏症発現との関連性の解明が指摘されている³⁾。すなわちB₁₂依存性酵素活性の低下に起因する二次的代謝変動の詳細については未だ検討の余地が多く残されており、従来判明しているB₁₂が関与する酵素反応のみでは十分説明できない代謝変動の報告も見られる。これらB₁₂欠乏症の発現機序並びにB₁₂の作用機序の解明には当然のことながらB₁₂欠乏モデルアニマルが極めて有用である。

著者らは現在までに明確なB₁₂欠乏状態のラットを飼育し、B₁₂欠乏により惹起される代謝変動の一端を報告した⁴⁻⁹⁾。今回は現在までに著者らが得ているB₁₂欠乏ラットの基礎成績を紹介する。

実験動物及び飼料組成

B₁₂の研究に用いられる実験動物はラット¹⁰⁻¹¹⁾が最も多く、ハムスター¹²⁾の報告も見られる。またサル¹³⁾、ヒヒ¹⁴⁾、コウモリ¹⁵⁾はB₁₂欠乏時に神経障害が発現することから、ヒトのB₁₂欠乏神経障害のア

ニマルモデルとして使用されている。またニワトリ¹⁶⁾、ウズラ¹⁷⁾等の家禽の成績も報告されている。しかしラットを用いた場合、B₁₂の生物学的半減期は長く、B₁₂欠乏ラットの飼育は長期間を要する。更にラットは糞食傾向にあること¹⁸⁾、B₁₂欠乏精製飼料の調製¹⁹⁾及び飼育には厳密な管理が必要であること²⁰⁾等が指摘されている。これらの理由から、明確なB₁₂欠乏状態のラットの飼育は困難とされており¹⁸⁾、B₁₂研究の隘路の一つとなっている。

著者らは妊娠、授乳期間を通しB₁₂欠乏飼料を給与した親ラットから出生、離乳した Wistar 系ラットを用い、B₁₂の胎盤通過の影響をできるだけ少

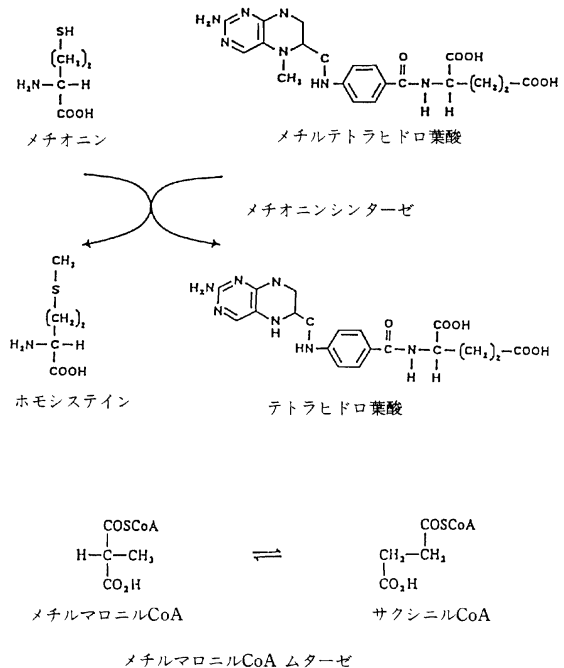


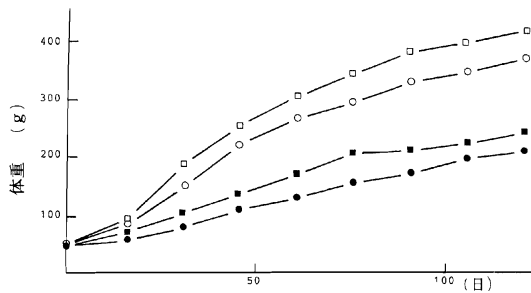
図1 高等動物におけるビタミンB₁₂依存性酵素

表1 ビタミンB₁₂欠乏飼料

ダイズタンパク質飼料	
	(g/100g 飼料)
分離ダイズタンパク質*1	18.0
無水グルコース	66.6
ラード	10.0
無機塩混合*2	5.0
ビタミン混合*2	0.25
塩化コリン	0.15
カゼイン飼料	
	(g/100g 飼料)
精製カゼイン	18.0
無水グルコース	66.6
ラード	10.0
無機塩混合	5.0
ビタミン混合	0.25
塩化コリン	0.15

* 1 市販分離ダイズタンパク質、タンパク質85%

* 2 Harpar, A.E., J.Nutr., 68, 405 (1959)

図2 ビタミンB₁₂欠乏ラットの成長

(各値は5例の平均)

ダイズタンパク質飼料

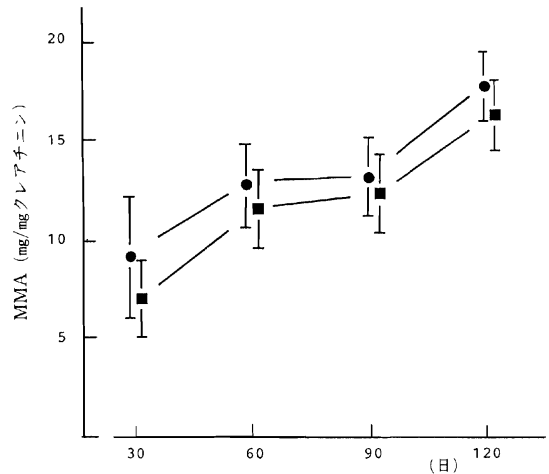
○—○ B₁₂給与●—● B₁₂欠乏

カゼイン飼料

□—□ B₁₂給与■—■ B₁₂欠乏

なくした²⁰⁾。またラットの飼育は厳密な飼育管理下で行った。すなわち微量のB₁₂の汚染を避けるため、他の栄養実験のラット並びに飼料から隔離、糞食のリスクを低下させるため、清潔な網目の荒い金網底のステンレスケージでラットを飼育した²⁰⁾。

B₁₂欠乏飼料の組成は研究者によって異なっている。飼料タンパク質として栄養価の高いカゼインを用いた報告^{11,21,22)}も見られるが、市販カゼインはB₁₂を含むのでカゼインを熱エタノールで処理し、B₁₂フリーにする必要がある。また市販されている

図3 ビタミンB₁₂欠乏ラットの尿中メチルマロン酸排泄量(各値は5例の平均値±標準偏差)

●—● ダイズタンパク質飼料

■—■ カゼイン飼料

ビタミンフリーカゼインも微量のB₁₂が含まれている。最近のB₁₂欠乏実験は欠乏飼料の調製が容易なことから、分離ダイズタンパク質を用いた飼料が多い^{10,23,24)}。更にアミノ酸混合を用いた報告も見られる²⁵⁾。著者らはダイズタンパク質及びB₁₂フリーカゼインをタンパク質源とした2種のB₁₂無添加飼料を用い、B₁₂欠乏ラットを飼育した。B₁₂無添加飼料の組成を表1に示した。

ビタミンB₁₂欠乏ラットの成長

B₁₂欠乏ラットの成長は遅延することが広く知られている。Fehlingら¹⁹⁾は48週間飼育したB₁₂欠乏ラットの体重は対照の約67%を示し、Frenkelら¹¹⁾は13週で80%であったと報告している。同様にBrinkら¹⁰⁾は0.5% DL-Met 添加20%ダイズタンパク質B₁₂欠乏飼料で39週間飼育したラットの成長は対照の約77%を示すことを報告している。Brinkら¹⁰⁾はこのラットの肝臓B₁₂レベルは12.3±0.4ng/gであり、骨髄及び末梢血液血液像の変化が認められることから、重篤なB₁₂欠乏状態であることを確認している。

著者らはダイズタンパク質及びカゼイン飼料でB₁₂欠乏ラットを140日間飼育したところ、ラットの成長は対照のそれぞれ約52%、55%といずれも

顕著な遅延が認められた。また B_{12} 欠乏ラットの飼育期間中の飼料摂取量のみならず飼料効率の低下も認めている。 B_{12} 欠乏ラットの成長を図-2に示した。最近著者らは pair-feeding で90日間飼育した B_{12} 欠乏ラットにおいても成長は遅延し、タンパク質栄養状態の指標となる血漿タンパク質レベル、尿中アラントイン、肝臓キサンチンオキシダーゼ活性が低下することを認めている²⁶⁾。この成績は B_{12} 欠乏により飼料タンパク質の利用が低下することを示し、飼料タンパク質の利用低下は Met synthase 活性の低下による Met availability 低下に起因するものと考えられる。

ビタミン B_{12} 欠乏ラットの尿中メチルマロン酸排泄量

140日間の飼育中における B_{12} 欠乏ラットの尿中メチルマロン酸 (MMA) 排泄量を図-3に示した。ダイズタンパク質飼料、カゼイン飼料ともに顕著な増加が認められた。 B_{12} 欠乏時の尿中 MMA 排泄量の増加は MMCoA mutase 活性低下によるメチルマロニル CoA からサクシニル CoA への転換の障害に起因する (図-1)。Brink ら¹⁰⁾は飼育40週の飼育期間中における B_{12} 欠乏ラットの尿中 MMA 排泄量は直線的に増加し、肝臓 B_{12} レベルの低下と相関することを報告している。Reed ら²²⁾は肝臓 MMCoA mutase 活性の低下が著しい場合、尿中 MMA 排泄量の増加が顕著であり、MMCoA mutase 活性が対照の50%に低下すると尿中 MMA 排泄量は $1.5\mu\text{mol}/24\text{日}/\text{g}$ 体重以上に増加することを報告した。更に Frenkel ら²⁷⁾は B_{12} 欠乏ラットの肝臓 B_{12} レベルが約 $30\text{ng}/\text{g}$ 肝臓以下に低下すると肝臓 MMCoA レベルの急激な増加が見られることを示した。このように尿中 MMA 排泄量は B_{12} 欠乏状態の有力な判定指標となり、しかもラットを屠殺せずに欠乏状態が判定できることから広く測定されている。しかし B_{12} 欠乏ラットの尿中 MMA 排泄量は飼料組成²⁸⁻³¹⁾、飼料への MMA 前駆体の添加¹⁸⁾、絶食¹⁸⁾等飼育条件によって影響されることも報告されている。

ビタミン B_{12} 欠乏ラットの臓器ビタミン B_{12} レベル

B_{12} 欠乏ラットの臓器 B_{12} レベルを図-4に示し

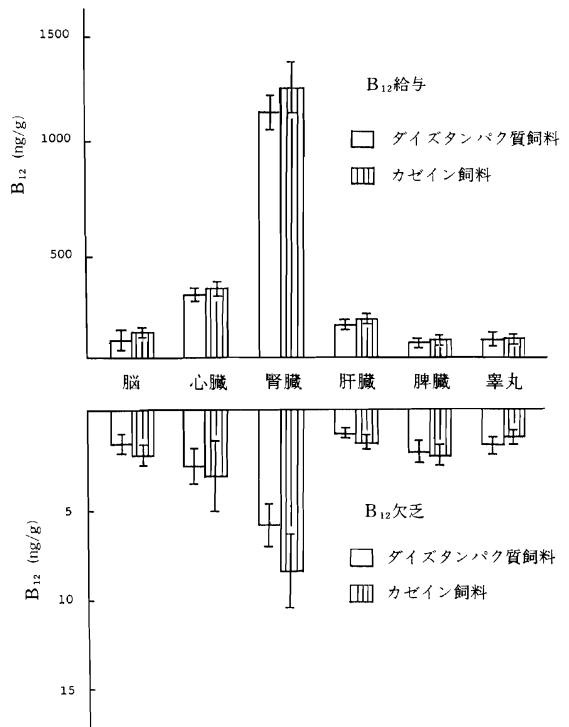


図4 B_{12} 欠乏ラットの臓器 B_{12} レベル (各値は5例の平均値±標準偏差)

表2 B_{12} 欠乏ラットの肝臓 B_{12} 依存性酵素の活性

	Met シンターゼ*		MMCoA ムターゼ*	
	p mol/mgタンパク質	n mol/g肝臓	p mol/mgタンパク質	n mol/g肝臓
B_{12} 給与	182.6±23.9	8.69±0.53	194.1±25.6	28.39±1.50
B_{12} 欠乏	9.2±1.6	0.34±0.06	10.8±4.3	1.34±0.54

* 各値は5例の平均値±標準偏差

た。いずれの臓器も B_{12} レベルの著しい低下が認められた。ラットの臓器 B_{12} 量に関する報告は多い。特に B_{12} 給与ラットでは腎臓 B_{12} 量が高いことはよく知られ³²⁻³⁴⁾、生体内の B_{12} の貯蔵、代謝における腎臓の機能についてもよく知られている^{35,36)}。Dryden ら³⁷⁾は189~301日飼育したラットの臓器 B_{12} レベルを測定し、 B_{12} 給与ラットでは腎臓が最も高値であり、脳下垂体、副腎、心臓が肝臓、脾臓、厚顔等に比べ高値を示すことを報告している。また B_{12} 欠乏ラットでは心臓 $19\pm 3\text{ng}$ 、肝臓 $11\pm 2\text{ng}$ 、脾臓 $17\pm 2\text{ng}$ 、腎臓 $69\pm 12\text{ng}$ 及び睾丸 5 ± 1

ng/g 臓器に低下することを認めている。また Brink ら¹⁰⁾は44週の B₁₂欠乏で肝臓 B₁₂レベルは7.9±2.8 ng/g 臓器に低下すると報告している。著者実験ではダイズタンパク質飼料、カゼイン飼料ともにこれらの報告に比べ低レベルを示した。

ビタミン B₁₂欠乏ラットの肝臓 B₁₂依存性酵素活性

ダイズタンパク質飼料で飼育した B₁₂欠乏ラットの肝臓 B₁₂依存性酵素活性を表-2 に示した。肝臓 MMCoA mutase 活性は B₁₂無給与により対照の約5%と顕著な低下を示した。B₁₂欠乏ラットの尿中 MMA 排泄量の顕著な増加は MMCoA mutase 活性の著しい低下からも支持される。また肝臓 Met synthase 活性も対照の約5%に低下することが認められた。B₁₂欠乏時の Met synthase 活性並びにその活性変動の影響を評価することは B₁₂と葉酸、メチオニン代謝の関連性を解明するうえで重要である。B₁₂欠乏ラットの肝臓 Met synthase 活性の報告は多く見られる^{22,38)}。Scott ら³⁶⁾は肝臓 B₁₂レベルが25~66ng/g 肝臓を示す軽度な B₁₂欠乏ラットの肝臓、腎臓 MMCoA mutase 活性はアポ酵素、ホロ酵素ともに低下するが、Met synthase 活性の変動は見られないと報告している。これは B₁₂欠乏初期では両酵素タンパク質の挙動が異なることを示すとともに MMCoA mutase は Met synthase に比べ早期に活性低下を起こす可能性を示唆したものと考えられる。

一方、近年 N₂O ガスが Cob(I)alamin を不活性化し、Met synthase 活性を低下させることが明らかにされている^{39,40)}。Kondo ら⁴¹⁾は N₂O ガス暴露ラットの Met synthase 活性は N₂O ガス暴露により約15%にまで低下することを報告した。このことから N₂O ガス暴露ラットは実験的 B₁₂欠乏モデルとして用いられ、B₁₂と葉酸、メチオニン代謝との関連の追究が進められている。著者らの B₁₂欠乏ラットでは B₁₂依存性酵素活性が極めて低値を示したことから B₁₂欠乏症の発現機序、並びに B₁₂の作用機序の解明のモデルアニマルとなり得ることが示唆された。

文 献

1) Taylor, R. T. : B₁₂ (Dolphin, D., ed.), Vol 2, p.307-

356, (A Wiley-Interscience Publication, New York) (1982).

- 2) Retey, J. : B₁₂ (Dolphin, D., ed.), Vol 2, p.357-380 (A Wiley-Interscience Publication, New York) (1982).
- 3) 森下玲児・内野治人：ビタミン学II，日本ビタミン学会編，p.558-565（東京化学同人，東京）（1980）。
- 4) 河田哲典・前川昭男・鈴木隆雄（1982）ビタミン B₁₂ 無給与シロネズミのヘム合成系酵素活性の変動。ビタミン，56，409-413。
- 5) 河田哲典・前川昭男（1985）ラットの肝臓ヘムタンパク質レベルに及ぼすビタミン B₁₂無給与の影響。ビタミン，59，101-107。
- 6) 土居 忠・河田哲典・前川昭男（1986）ビタミン B₁₂無給与ラットにおける肝内ビタミン B₁₂依存性酵素活性の変動。ビタミン，60，205-209。
- 7) Doi, T., Kawata, T., Tadano, N., Iijima, T. and Maekawa, A. (1989) Effect of vitamin B₁₂ deficiency on S-adenosylmethionine metabolism in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 35, 1-9.
- 8) Doi, T., Kawata, T., Tadano, N., Iijima, T. and Maekawa, A. (1989) Effect of vitamin B₁₂ deficiency on the activities of hepatic cystathionine β-synthase in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 35, 101-110.
- 9) Kawata, T., Takada, T., Morimoto, F., Fujimoto, N., Yamada, K., Wada, M., Tadokoro, T., Maekawa, A. and Tanaka, N. Effect of vitamin B₁₂ deficiency on testes tissue in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 投稿中。
- 10) Brink, J. J., Beck, R. A., Miller, J. S. and Thenen, S. W. (1980) Relationship of urinary methylmalonic acid to vitamin B₁₂ concentration and hematological changes in rats fed vitamin B₁₂-deficient diet. J. Nutr., 110, 1338-1346.
- 11) Frenkel, E. P. and White, J. D. (1973) Characterization of an animal model of vitamin B₁₂ deprivation. Lab. Invest., 29, 614-619.
- 12) Tseng, R. Y. L., Cohen, N. L., Reyes, P. S. and Brigges, G. M. (1976) Metabolic changes in golden hamsters fed vitamin B₁₂-deficient diets. J. Nutr., 106, 77-85.

- 13) Kark, J. A., Victor, M., Hines, J. D. and Harris, J. W. (1974) Nutritional vitamin B₁₂-deficiency in rhesus monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.*, **27**, 470—476.
- 14) Jacob, F. and Siddons, R. C. (1977) Sparing effect of folic acid deficiency on the development of vitamin B₁₂ deficiency in baboons fed a vitamin B₁₂ deficient diet. *J. Nutr.*, **107**, 1822—1827.
- 15) Metz, J. and van der Westhuyzen, (1987) Mini review. The fruit bat as experimental model of the neuropathy of cobalamin deficiency. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88A**, 171—177.
- 16) Looi, S. H. and Renner, S. (1974) Effect of feeding "carbohydrate-free" diets on the chicks requirement for methionine. *J. Nutr.*, **104**, 400—404.
- 17) 乾 孝之・河田哲典・前川昭男・鈴木隆雄 (1982) ビタミン B₁₂ の日本ウズラの産卵及び孵化成績に及ぼす影響. *ビタミン*, **56**, 297—301.
- 18) Williams, D. L., Spray, G. H., Newman, G. E. and O'Brien, R. P. (1969) Dietary depletion of vitamin B₁₂ and the excretion of methylmalonic acid in the rat. *Br. J. Nutr.*, **23**, 343—352.
- 19) Fehling, C., Jagerstad, M., Akesson, B., Axelsson, J. and Burn, A. (1978) Effect of vitamin B₁₂ deficiency on lipid metabolism of the rat liver and nervous system. *Br. J. Nutr.*, **39**, 501—513.
- 20) 前川昭男：ビタミン学実験法II, 日本ビタミン学会編, p.272—282 (東京化学同人, 東京) (1985).
- 21) Dryden, L. P. and Hartman, A. M. (1966) Effects of vitamin B₁₂ on the weight of certain organs in the rat. *J. Nutr.*, **90**, 377—381.
- 22) Reed, E. B. and Tarver, H. (1970) Urinary methylmalonate and hepatic methylmalonyl coenzyme A mutase activity in the vitamin B₁₂-deficient rat. *J. Nutr.*, **100**, 935—948.
- 23) Keating, J. N., Kusano, G. and Stokstad, E. L. R. (1988) Effect of thiouracil in modifying folate function in severe vitamin B₁₂ deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, 119—124.
- 24) Watanabe, F., Nakano, Y., Tachikake, N., Saido, H., Tamura, Y. and Yamanaka, H. (1991) Vitamin B₁₂ deficiency increases the specific activities of rat liver NADH- and NADPH-linked aquacobalamin reductase isozymes involved in coenzyme synthesis. *J. Nutr.*, **121**, 1948—1954.
- 25) Brass, E. P. and Ruff, L. J. (1989) Effect of carnitine on propionate metabolism in the vitamin B₁₂-deficient rat. *J. Nutr.*, **119**, 1196—1202.
- 26) 前川昭男・河田哲典・和田政裕・山田和弘・田所忠弘 (1991) ビタミン B₁₂ 欠乏ラットにおける飼料タンパク質の利用. 第324回ビタミン B 研究委員会要旨, *ビタミン*, **65**, 641.
- 27) Frenkel, E. P., Kitchens, R. L., Hersh, L. B. and Frenkel, R. (1974) Effect of vitamin B₁₂ deprivation on the *in vivo* levels of coenzyme A intermediates associated with propionate metabolism. *J. Biol. Chem.*, **249**, 6984—6991.
- 28) Stokstad, E. L. R. and Nair, C. P. P. (1988) Effect of hypothyroidism on methylmalonate excretion and hepatic vitamin B₁₂ levels in rats. *J. Nutr.*, **118**, 1495—1501.
- 29) 河田哲典・土居 忠・飯島健志・前川昭男 (1986) ラットのビタミン B₁₂ 欠乏状態の発現に及ぼす飼料タンパク質の影響. *ビタミン*, **63**, 401—408.
- 30) Cullen, R. W. and Oace, S. M. (1989) Fermentable dietary fibers elevate urinary methylmalonate and decrease propionate oxidation in rats deprived of vitamin B₁₂. *J. Nutr.*, **119**, 1115—1120.
- 31) Cullen, R. W. and Oace, S. M. (1989) Dietary pectin shortens the biologic half-life of vitamin B₁₂ in rats by increasing fecal and urinary losses. *J. Nutr.*, **119**, 1121—1127.
- 32) Grossowicz, N., Jablonska, M., Izak, G. and Rachmilewitz, M. (1970) Vitamin B₁₂ concentration of serum and tissues of vitamin B₁₂-depleted rats. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **23**, 127—131.
- 33) Quadros, E. V., Matthews, D. M., Wise, I. J. and Linnell, J. C. (1976) Tissue distribution of endogenous cobalamins and other corrins in the rat, cat and guinea pig. *Biochem. Biophys. Acta.*, **421**, 141—152.
- 34) Linnell, J. C., Willson, M. J., Mikol, Y. B. and Poirier, L. A. (1983) Tissue distribution of methylcobalamin in rats fed amino acid-defined, methyl-deficient diets. *J. Nutr.*, **113**, 124—130.

- 35) Okuda, K. (1962) Relationship between intake of vitamin B₁₂ and its storage by kidney in the rat. *J. Nutr.*, **77**, 131—136.
- 36) Scott, J. S. D., Treston, A. M., Bowman, E. P. W., Owens, J. A. and Cooksley, W. G. E. (1984) The regulatory roles of liver and kidney in cobalamin (vitamin B₁₂) metabolism in the rat ; the uptake and intracellular binding of cobalamin and the cobalamin-dependent enzymes in response to varying cobalamin supply. *Clin. Sci.*, **67**, 299—306.
- 37) Dryden, L. P. and Hartman, A. M. (1966) Relative concentration of vitamin B₁₂ in the organs of the male rat as affected by its intake of the vitamin. *J. Nutr.*, **90**, 382—386.
- 38) Katzbach, C., Galloway, E. and Stokstad, E. L. R. (1967) Influence of vitamin B₁₂ and methionine on levels of folic acid compounds and folate coenzymes in rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124**, 801—805.
- 39) Deacon, R., Lumb, M., Perry, J., Chanarin, I., Minty, B., Halsey, M. and Nunn, J. (1980) Inactivation of methionine synthase by nitrous oxide. *Eur. J. Biochem.*, **104**, 419—422.
- 40) Wilson, S. D. and Horne, D. W. (1986) Effect of nitrous oxide inactivation of vitamin B₁₂ on the levels of folate coenzymes in rat bone marrow, kidney, brain, and liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 248—253.
- 41) Kondo, H., Osborne, M. L., Kolhouse, J. F., Binder, M. J., Podell, E. R. and Utley, C. S. (1981) Nitrous oxide has causes decreases in activities of both mammalian cobalamin-dependent enzymes in rats. *J. Clin. Invest.*, **67**, 1270—1283.