原 著

ソルビトールのビタミンB₂節約作用機構
に関する研究 (第2報)Studies on the Mechanism of Riboflavin Sparing Action
by D-Sorbitol in Rat (Report 2)

国立栄養研究所栄養改善部

(Division of Nutrition Improvement, the National Institute of Nutrition, Tokyo, Japan)

印 南 敏 (S. Innami) 手 塚 朋 通 (T. Tezuka)

It was previously confirmed that D-Sorbitol has the riboflavin sparing action in rats. When sorbitol is supplemented in the diet of rats, the almost vitamin synthesis in the intestine of rats occur in cecum.

So, it is most important problem to investigate that the vitamin synthesized in cecum exist in what form to confirm the mechanism of vitamin sparing action.

Then, in this paper the following experiments have been performed. The diet composition was shown in Table 1. The content of cecum of rats in 15% sorbitol diet group after one month feeding was gently homogenated with mortar. The supernatant and precipitate were obtained by twice centrifuging the homogenate for 30 minutes at 11,000 r. p. m. .

The combined precipitate was diluted with water and was treated 80 °C, 15 minutes, and after was centrifuged for 20 minutes at 3,000 r. p. m. .

The riboflavin content and the three different type of riboflavin in supernatant and precipitate were measured by Yagi's riboflavin assay method, respectively.

The results are shown in Table 2~3 and Figure 1.

The riboflavin content in supernatant and precipitate are approximately 10 µg and 110 µg in average, respectively. Only flavin mononucleotide (FMN) was found in supernatant solution, but in precipitate the great amounts of flavin adenine-dinucleotide and flavin mononucleotide and a trace amount of free riboflavin (FR) were found.

It is very interesting to be finding only (FMN) in supernatant. It is the important problem to research by what and from what FMN is occurred, or whether FMN in supernatant is directly absorbed from cecum or not.

At any rate, the following experiment has been done. The supernatant solution was dialyzed with distilled water by using cellophan tube for 2 day at 0~2°C. The result in table 3 showed

that the considerable amounts of FMN was dialyzed. This result seems to indicate that FMN transferred to supernatant in cecum may be absorbed from cecum.

緒 言

さきにビタミンB₂欠乏飼料中の蔗糖の一部をソルビトールで置き換えた場合、ソルビトールがB₂節約作用¹⁾を有することを確かめ、さらにその作用機構を究めるために、Barnes²⁾らの考案による糞食阻止装置であるTail cup³⁾を用いて実験を行ない報告したが、前報にのべた通り、Tail cupは糞食阻止装置としては適当なものとは思われなかった。そこで、これに代わるものとしてギブス法⁴⁾を考案した。これはネズミがからだを折り曲げて肛門より直接糞食するのを防ぐことを目的としたものである。この方法はTail cup法より操作も簡単ではずれることも少なく、ストレスも少ないという利点があるが、糞の切れが悪く(ソルビトール食の糞は軟い)カゴを汚すので完全に糞食を阻止することができなかった。従って、ストレスも少なく完全な糞食阻止装置を考案することの難しさを知った。このことはとりもなおさずソルビトールのB₂節約作用機構が糞食にあるものか否かについての決め手をつかみにくいということを意味している。

そこで、今回は方向を変えてソルビトール投与ネズミの盲腸内におけるB₂が吸収し易いような状態にあるかどうか、あるいはその量がどの位あるかなどを知ること、ソルビトールのB₂節約作用機構を知る上の有力な手がかりになると考えて次のような実験を行なったので報告する。

実験方法

1. 試験動物および飼料組成: Wistar系の約60~65gの雄のシロネズミを第1表に示すごとき飼料にて約1ヵ月飼育後屠殺して実験に供した。

Table 1. Diet composition

Diet	Control group	Sorbitol supplemental group
Sucrose	65	50
D-sorbitol	—	15
Casein	20	20
Soy bean oil*	10	10
Mineral mixture	4	4
Vitamin mixture**	1	1

* This contains 1 gram of cod liver oil including 10 mg of α -tocopherol.

** No riboflavin.

2. 盲腸内容物の分画法並びにB₂三型分画定量法: 約1ヵ月飼育後屠殺して盲腸から腸壁を傷つけないように静かに内容物を取り出し、できるだけ温和な条件で乳鉢にて徐々に水を加えながら盲腸内容物をホモジナイズしたものを冷凍高速遠心器を用い、0°Cにて11,000 r. p. m., 30分ずつ2回遠沈した上清(温水処理せず)と沈澱区分の温水浸出液について、八木法により総B₂量⁵⁾を測定すると同時に、B₂三型の分画定量⁶⁾を行なった。

3. Eremothecium ashbyiiよりG compound(8-N-Ribityl-6, 7-dimethylumazine)の分離精製法
E. ashbyiiの胚芽培養物より増田の方法⁷⁾に従ってG物質の分離精製を行なった。第1図は精製したG物質(水溶液)の島津自記分光光度計により描いた吸収曲線であって $\lambda_{\max}$ は257m μ , 408m μ である。増田記

載によれば、 $\lambda_{\max}$ 258m μ と 407m μ であってほぼ一致しているが、未だ僅かに不純物を含んでいるようである。

Fig. 1 Absorption spectra of G compound
(8-N-Ribityl-6, 7-dimethylumazine)
isolated from *E. ashbyii*

実験結果並びに考察

B₂ 欠乏食あるいは15%ソルビトール食を与えたネズミの盲腸ホモジネートを11,000 r. p. m. にて2回遠沈した上清（温水処理せず）と沈澱区分の温水浸出液について B₂ 量を測定すると同時に B₂ 三型の比率について検討した結果は第2表に示すごとく、遠沈上清区分においては B₂ 欠乏群で平均約 2 μ g, ソルビトール投与群で平均約 10 μ g, 沈澱区分においては B₂ 欠乏群で平均約 22 μ g, ソルビトール投与群で平均約 110 μ g の B₂ が含まれていた。上清区分の B₂ 量は B₂ 欠乏群でもソルビトール投与群でも沈澱区分の B₂ 量の約5分の1程度であった。

Table 2. Measurements of FAD, FMN and FR in cecum contents

Group	Body weight	Cecum contents weight	Division	Total riboflavin	FAD	FMN	FR
	gm	gm		μ g	%	%	%
Riboflavin deficient	85.0	2.1	Supernatant	1.67	—	100	—
			Precipitate	21.55	62.7	35.2	2.1
Sorbitol supplemented	145.3	5.9	Supernatant	9.73	—	100	—
			Precipitate	107.11	71.0	24.1	4.9

また、上清区分の B₂ は B₂ 欠乏群、ソルビトール投与群のいずれにおいても主として FMN（第2図, Rf 0.10, Rf 0.14）に相当するものであり、FAD, FR はほとんど見出せなかった。沈澱区分では FAD, FMN が大部分で FR は極めて少なかった。

なお、ソルビトール投与群では FMN の外に緑色の螢光を放つ2コスポットが見出されたが、量的に少ないので同定は困難であった。参考までに *E. ashbyii* の培養汙液より Florisil column を通して精製した B₂ 生合成の中間体といわれる G 物質（8-N-Ribityl-6, 7-dimethylumazine）と比較したが、G₁ のみ Rf 値がほぼ似かよっていたことを確かめ得ただけで、同一物質であるか否かについては今後の検討にまらたい。

片桐らによれば、*E. coli*, *A. aerogenes* なども G 物質から、B₂ を生合成することが知られているし、ソル

Fig. 2 Paperchromatograms of fluorescences in supernatant of rat cecum contents

ビトール投与により上述のごとく大量の B₂ が生成されることを考えれば, B₂ 生合成の中間体としての G 物質が存在しても不思議でないかも知れないが, 多くは菌体内で合成されるものであって上清中に存在するという点については問題が残るであろう。

しかしながら, 問題は上清区分に存在する FMN 様物質の由来とそれが吸収利用されるか否かということであって, もし吸収されるとすれば, 10 μg あれば糞食によらずともかなりの成長を示すことは可能であると考えられる。

そこで, 上清区分の FMN 様物質が容易に吸収されるような形で存在するか否かを知る目的で上清の透析実験を行ってみた。セロファンチューブを用い, 上清 40 ml を入れ, 蒸留水を透析外液とし, 0~2°C で 2 日間透析した結果は第 3 表に示すごとくで上清 B₂ 量の約 2/3 が透析されることを知った。Phosphatase の阻害剤として NaF を加えたものでも大差はみられなかった。加熱したものは組織の温水抽出と全く同じと考えてよく, 当然透析され得ることが考えられる。

Table 3. Dialysis of supernatant solution obtained from cecum of rat fed sorbitol supplemented diet*

Treatment of supernatant	Riboflavin found in cellophane tube μg/40 ml of supernatant
1 Control	1.69
2 Supernatant dialyzed	0.65
3 Supernatant dialyzed, 0.05 M NaF added	0.75
4 Supernatant dialyzed, heated at 80°C, for 15 min.	0.69

* Dialysis was held in refrigerator at 0~2°C, for 48 hours.

以上のことから, 著者はソルビトール投与ネズミにおける B₂ 節約作用は必ずしも糞食だけによるものではないと推定している。

B. S. Wostmann⁹⁾ らは ³⁵SO₄ を胃管を用いたり, あるいは直接盲腸内に注射して腸内細菌によって合成された ³⁵S-B₁ が心臓や肝臓から検出できるか否かを試験して失敗したと盲腸内容物のホモジネートの上清区分に遊離型 B₁ の見出されないことから, 腸内で合成される B₁ の宿主への利用ということは問題にするに当たらないとのべているが, 彼らの用いた飼料は腸内におけるビタミン合成の少ないもので, しかも complete diet であるところに問題がある。従って, 彼らのデータは普遍的なものでなく, 腸内ビタミン合成の多い乳糖やソルビトールやデキストリンを含む飼料の場合には必ずしも当てはまらないと思われる。

いずれにしても, ソルビトール投与ネズミの盲腸内容物上清中の FMN 様物質がどのようにして生成したもののか, 今後の解明にまたなければならないが, 遊離の B₂ が全然存在せず FMN 様物質のみ存在するということはかなり特異な現象といわなければならない。

要 約

ソルビトールの B_2 節約作用機構を知るために、 B_2 欠乏あるいはソルビトール投与ネズミの盲腸内における B_2 が吸収し易いような状態にあるかどうか、あるいはその量がどの位あるかなどについて検討した結果、

1) 上清区分の総 B_2 量は B_2 欠乏群で平均約 2 μg 、ソルビトール投与群で平均約 10 μg 、沈澱区分の総 B_2 量は B_2 欠乏群で平均約 22 μg 、ソルビトール投与群で平均約 110 μg で、両区分とも、ソルビトール投与群の方が欠乏群の 5 倍の含量を示していた。

2) 上清区分の B_2 は B_2 欠乏群、ソルビトール投与群のいずれにおいても、主として FMN に相当するものであり、FAD、FR はほとんど見出せなかった。沈澱区分では FAD、FMN が大部分で FR は極めて少なかった。

3) 上清の透析実験を試みた結果、上清中に含まれる FMN 様物質の大部分が透析されることを知った。

4) 以上のことから、ソルビトール投与ネズミにおける B_2 節約作用は必ずしも糞食だけによるものではないと推定した。

文 献

- 1) 印南, 高居, 見目, 岩尾: 栄養学雑誌, 19, 204 (1961)
- 2) R. H. Barnes, G. Fiala, B. McGehee, A. Brown: *J. Nutrition*, 63, 489 (1957)
- 3) 印南, 手塚, 今川, 斎藤: 栄養学雑誌, 21, 143 (1963)
- 4) 印南, 手塚: 国立栄養研究所報告, 昭和38年度, p. 55
- 5) 八木: ビタミン, 9, 349 (1955)
- 6) 八木: *J. Biochem*, 51, 231 (1962)
- 7) T. Masuda: *Pharmaceutical Bulletin*, 4, 375 (1956)
- 8) 片桐, 今井, 武田: ビタミン, 20, 361 (1960)
- 9) B. S. Wostmann, P. L. Knight: *J. Nutrition*, 74, 103 (1961)

(受付: 昭和40年7月1日)

抄 録

大豆蛋白と生長 Effect of Casein and Soy Protein Diets on the Growth of Ducklings. Dan A. Richert, W. W. Westerfeld: *J. Nutrition*, 86, 17 (1965)

蛋白質源として大豆蛋白とカゼインを用い、鴨の生長について比較実験を行ってみた。その結果、35%カゼイン飼料、或いは10%のゼラチンを添加した25%カゼイン飼料よりも、メチオニンとグリシンを添加した30~35%の大豆蛋白飼料の方が、よい發育

を示した。またこの場合に、Fish-Soluble Factor の供給源になるようなものが、飼料の中に加えられていなくても、良い生育を示したことは注目する要があろう。

カゼインと大豆蛋白では、アミノ酸組成に差異があるわけだが、これは考える必要がある。

カゼイン飼料では、10%の綿実ミールを添加してやると効果が上がり、最大生長を示すようになる。

(岩尾)