ビタミン A 生成および分解に及ぼすアフラトキシンの影響

カ 石 サ ダ*, 鈴 江 緑衣郎

*国立栄養研究所

Effect of Aflatoxin on the Biosynthesis and Degradation of Vitamin A

Sada Chikaraishi and Ryokuero Suzue

The National Institute of Nutrition

Aflatoxin is a toxic substance which is contained in *Aspergillus flavus* grown in rice or peanuts on the tropics. It causes great damage on liver and other organs, especially causes carcinoma in animal liver.

In the tropics, we often find vitamin A deficiency. As for one of these reasons, we supposed that aflatoxin must inhibit the converting enzyme activity from β -carotene to vitamin A. To confirm this supposition, we employed a vitamin A deficient rat and examined the effect of aflatoxin on the conversion of β -carotene to vitamin A.

Male Sprague-Dawley rats, weighing about 40 g, were fed a vitamin A deficient diet for 51 days. Then, they were divided into four groups; the control group, aflatoxin administrated group, aflatoxin and β -carotene administrated group, β -carotene administrated group. After 10 days, they were sacrificed and the contents of vitamin A in the livers were assayed. The body weights of β -carotene group were increasing gradually, but that of the other three groups were decreasing continuously. Contents of vitamin A in liver were highest in the β -carotene group, but were extremely low in the other three groups.

The effect of aflatoxin on the degradation of vitamin A was also examined. Amounts of 0.5 ppm or 0.2 ppm of aflatoxin was administered in rats for 30 days. Rats were killed and their livers were homogenized and centrifuged. The microsomal fraction was used as enzyme solution. The activity of NADPH-cytochrome C reductase and the amount of P-450 were increased by the administration of aflatoxin. From these results, it is concluded that the prolong intake of aflatoxin has a tendency to promote vitamin A degradation.

Jap. J. Nutr., 35 (4) 193~197 (1977)

南方において米や落花生などに生えるカビ *Aspergillus flavus* に含まれているアフラトキシンの毒素は肝臓その他の臓器に重大な障害を与えることが知られている。例えば肝臓細胞の退行性変性を起こさせ、肝臓でのたん白質の生合成を抑え、肝臓ガンを発生させることが報告されている¹⁾²⁾。一方南方においてはビタミン A 欠乏症に基づく各種欠乏疾患が多発していることが報告されている。ビタミン A の一部は β -カロチンから体内で生成されるため、アフラトキシンの毒素によりビタミン A の生合成が抑えられる可能性は当然考えられる。またアフラトキシンの投与により肝ミクロソームの薬物代謝酵素系の活性が増加する可能性があるため、ビタミン A の分解も増大することも考えられる。すなわちアフラトキシンの投与によりビタミン A の生成が抑えられ、分解が増加し、そのため体内のビタミン A 量の減少が起こる可能性があるのではないかと考えられる。

前報¹⁾³⁾においてラット肝臓および小腸粘膜を用いて *in vitro* の実験を行ない、 β -カロチンからビタミン A への転換がアフラトキシンの毒素によって阻害され、その結果ビタミン A 欠乏症が発生しやすい可能性があることを

* 現在 神奈川県立栄養短期大学

示した。そこで、*in vivo* でもそれと同じ結果を得ることができる可能性をみるためラットを用いた実験を行なった。またビタミンA分解に及ぼすアフラトキシンの影響をみるためにミクロソーム薬物代謝酵素系の活性も測定した。

実 験 方 法

実験材料：アフラトキシンは Makor Chemicals (Jerusalem, Israel) 製を、 β -カロチンは Merck 製のものを、2,6-Dichlorophenolindophenol sodium 塩およびSodium dithionite はいずれも和光純薬製のものを、その他の試薬も分析用試薬を使用した。

ラットは体重 40~50 g の Sprague-Dawley 系雄ラットを使用し、特別の場合を除き市販の固型飼料（日本クレア—CE2）で飼育した。

ビタミンA欠飼料はオリエンタル酵母より入手した。その組成は次の通りである。

コーンスターチ38%, α -化バレイショでん粉10%, ビタミンフリーカゼイン25%, セルローズ8%, リノール油6%, 塩混合6%, 砂糖5%, ビタミンAを除いたビタミン混合2%。

ビタミンA 定量法：ビタミンAの定量は河合製薬研究所の上田博士に依頼した。その分析方法は次の通りである。できる限り多くの肝臓を細断し、1 ml のピロガロールエタノール液および30 mlの水酸化カリウム溶液に加え、70°C に加熱、それを 50 ml のベンゾールで抽出し、そのうち 40 ml のベンゾール液で取り出し 2 ml まで蒸発する。活性化したアルミナカラムを通し、ベンゾールで溶出する。それを蒸発乾固し、再びクロホルムに溶解し、三塩化アンチモンを加え、直ちに 620 m μ で測定した。

NADPH-Cytochrome C reductase の活性測定法⁶⁾：酵素反応組成は次の通りである。

NADPH	0.3 μ moles
2,6-Dichlorophenolindophenol	316 m μ moles
リン酸緩衝液 pH 7.7	16.5 m moles
酵素液	0.1 ml

全量 3.3 ml として 25°C における 600 m μ の吸収の減少を Gilford spectrophotometer で測定した。この場合1分間に1.0の吸光度の変化を1単位と定義した。

P-450 のたん白質定量法⁷⁾：摘出した肝臓を生理的食塩水で灌流し、完全に脱血させる。肝臓を Potter のホモゲナイザーで 0.25 M 蔗糖液とともにホモゲナイズし、超遠心器にかけ、15,000 g と 105,000 g との間の分割を採る。これがミクロソーム分割である。それをリン酸緩衝液に浮遊させ、少量のSodium dithionite を加えた後、2個のキューベットに分け、一方を対照とし、一方に CO ガスを数秒通ずる。その両者をユニオンの自記分光光度計で測定し、450 m μ と 490 m μ の吸収の差より、文献記載の計算式を用いて P-450 の定量値とした。

実 験 結 果

1) ビタミン A 生合成に及ぼすアフラトキシンの影響

SD 系雄ラット40匹を用い、実験を行なった。ビタミンA欠乏飼料を与えた場合、図1で示されるように45日目から体重の減少が始まった。

51日目から β -カロチン(400 IU/day)投与群、 β -カロチン(400 IU/day)+アフラトキシン(0.2 mg/day) 投

与群, アフラトキシン (0.2 mg/day) 投与群, 対照群の4群に分けた。その結果は図2で示されているように β -カロチン投与群のみ体重は再び増加し始めたが, 他の3群はいずれも体重の減少がみられた。このことより, β -カロチンのみを投与した場合, 体内でビタミンAが生成され, ビタミンA欠乏症状を改善しうるが, β -カロチンとアフラトキシン同時投与の場合はビタミンAへの転換が抑えられていることを示している。

表1は4群に群分けしてから10日目の肝臓中のビタミンA量を示している。これでもわかるように β -カロチンのみを投与した場合が, ビタミンAの生成量が最大でアフラトキシン投与により β -カロチンからビタミンAへの転換が抑えられる傾向を示していた。これは前報の *in vitro* の実験結果と一致している⁴⁾⁵⁾。

2) ビタミンA分解に及ぼすアフラトキシンの影響

印南らはPCBを投与した場合, 肝臓中のビタミンA量が減少するが, それは肝臓のミクロソーム中の薬物代謝酵素系の活性がPCBで誘導されるのが原因であろうと推測している⁶⁾。そこでわれわれも肝ミクロソーム酸化酵素系の活性に及ぼすアフラトキシンの影響に関する実験を行なった。

ラット18匹を3群に分け, アフラトキシン 0.2ml投与群, 0.05ml投与群, 対照群とした。餌は市販の固型飼料(日本クレアCE2)を自由摂取させた。アフラトキシンは10 mgのアフラトキシン B₁ を Dimethylsulfoxide 10mlに溶解し, 毎日0.2 ml または

0.05mlを強制的に経口投与した。対照群には Dimethylsulfoxideのみを毎日 0.2 ml経口投与した。21日目にラットを断頭し, 肝臓中のNADPH-Cytochrome C reductase活性および肝臓中の P-450 の量を測定した。

図3は実験期間中の体重の増減を示すが, アフラトキシン投与により体重の増加は抑えられていることがわかる。

表2は肝臓の重量を示すが, アフラトキシン投与により減少する傾向をみせていた。ただ体重当りにすれば

Fig. 1 Changes in body weight of rat receiving vitamin A deficient diet

Fig. 2 Changes in body weight of rats. They were fed vitamin A deficient diet for 51 days.

They were divided into four groups. Each group received the diet indicated on the figure for 10 days

Table 1 Amount of vitamin A in rat livers

	Vitamin A (IU/g)
β -Carotene+Aflatoxin	0.32
Control (Vitamin A deficiency)	0.26
Aflatoxin (0.2 mg/day)	0.17
β -Carotene(400 IU/day)	0.45

Rats were fed vitamin A deficient diet for 51 days. They were divided into four groups. Each group received the diet indicated on the table for 10 days.

Fig. 3 Changes in body weight of rat receiving 0.05 ppm or 0.2 ppm of aflatoxin.

Table 2 Liver weights of rats

Dose rate of aflatoxin	(g)
Control	10.6±0.5
0.05 ppm	10.0±0.4
0.2 ppm	8.6±0.4

All values represent mean±S. E. Rats were fed aflatoxin or free diets for 21 days.

それほど著明な差はみられない。

肝ミクロソームの酸化酵素系の律速酵素は NADPH-Cytochrome C reductase である。表3はこの酵素活性を示してある。

Table 3 Effect of aflatoxin on activity of NADP-Cytochrome C reductase and hepatic P-450 contents

Dose rate of aflatoxin	NADPH-Cytochrome C reductase (units/mg protein)×10 ⁻²	Microsomal P-450 (nanomoles/mg protein)
Control	15.5±0.4	0.76±0.06
0.05 ppm	18.0±1.5	1.10±0.08
0.2 ppm	21.9±1.4	4.76±0.73

The results are expressed as mean±S. E.

このことからアフラトシキン投与により酵素活性が誘導されてきていることがわかる。

表3に肝ミクロソーム中の P-450 たん白量を示してある。対照群では 0.76 n mole/mg protein なのに比べて、0.2 ppm アフラトシキン投与群では 4.76 n mole/mg protein のように著しく量が増えている。このことから、アフラトシキン投与により肝ミクロソームの酸化酵素系活性が誘導されていることがわかる。

この酵素系はまたビタミンAを酸化分解する可能性が印南らにより推測されている⁸⁾。そこで肝臓内のビタミンA量を表4に示した。肝g当りのビタミンA量は対照群では 30 IU なのに対して 0.05 ppm アフラトシキン投与群では 25.7 IU、0.2 ppm アフラトシキン投与群では 20.4 IU と著しく低下していた。

Table 4 Content of Vitamin A in liver of rats

Dose rate of aflatoxin	IU/g Liver
Control	30.0
0.05 ppm	25.7
0.2 ppm	20.4

考 察

アフラトキシンは肝臓を初め、全身の組織に強い毒性を示す。そのためビタミンA欠乏症状を呈する理由はいろいろ考えられる。(1)餌の摂取量の低下、(2)腸管からのビタミンA吸収力の低下、(3)β-カロチンからビタミンAへの転換力の低下、(4)ビタミンA輸送に関与するビタミンA結合たん白質量⁹⁾の低下、(5)粘膜損傷や体内における代謝変動によるビタミンA必要量の増加、(6)肝ミクロソーム酸化酵素系活性増大によるビタミンA代

謝量の増加。表4はこれらの総合的な結果を示したものであるが、ビタミンA量はアフラトキシン投与により明らかに減少していることがわかった。

本報文においてはこのうちとくに β -カロチンからビタミンAの転換能力、および肝ミクロソーム酸化酵素系の酵素誘導現象の2つをとり上げて研究してみた。これは最もアフラトキシンの影響を受けやすい要因であると考えられたからである。このうち β -カロチンからビタミンAへの転換力は以前行なった腸粘膜および肝臓を用いた *in vitro* の実験と今回の *in vivo* での実験において、結果は完全に一致していた。

一方肝ミクロソーム酸化酵素系は薬物や⁹⁾¹⁰⁾ PCB, BHC, DDT その他多くの脂溶性物質により誘導を受けることが知られている。今回の実験によりアフラトキシン投与によっても、この酵素系の誘導が起こることがはっきりしたわけで、今後の公害物質の解毒作用機構を調べる場合にも参考となると考えられる。

南方におけるビタミンA欠乏症多発の原因はいろいろ考えられる。ビタミンA摂取量の不足、たん白質摂取量不足によるビタミンA結合たん白質量の低下や一般身体機能低下によるビタミンA利用率の低下、高温によるビタミンA消費量の増大などであるが、本報にて述べたように、アフラトキシンによる影響も原因の1つと考えても矛盾はしないと思われる。

要 約

アフラトキシン投与によるビタミンA欠乏症状発生の原因を追求するため、 β -カロチンからビタミンAへの転換に及ぼすアフラトキシンの影響と、肝臓内でのビタミンA代謝に与かる肝ミクロソーム酸化酵素系の誘導に及ぼすアフラトキシンの影響について実験を行なった。ビタミンA欠乏ラットに β -カロチンを投与すれば体重の回復が起こり、肝臓内のビタミンA量も増加するが、 β -カロチンとアフラトキシン同時投与では体重は減少を続け、肝臓内のビタミンA量も少なかった。以上のことから β -カロチンからビタミンAへの転換はアフラトキシンで抑えられることがわかった。またビタミンA代謝作用がある肝ミクロソーム酸化酵素系はその律速酵素である NADPH-Cytochrome C reductase 活性および、電子伝達系構成たん白質である P-450 はともにアフラトキシンにより増加し、その結果アフラトキシン投与によりビタミンAの代謝能力も増加することがわかった。

ビタミンA定量に御協力をいただいた河合製薬研究所上田文雄博士に深謝する。

文 献

- 1) Clifford, J. I., and Rees, K. R. : *Biochem. J.*, **102**, 65 (1967)
- 2) Butler, W. H., and Clifford, J. I. : *Nature*, **206**, 1046 (1965)
- 3) Domen, H. A. P. C., McLaren, D. S., & H. Escapini : *Trop. Geogr. Med.*, **16**, 271 (1964)
- 4) 力石サダ, 鈴江緑衣郎 : 栄養学雑誌, **32**, 176 (1974)
- 5) 力石サダ : 神奈川県立栄養短期大学紀要, **9**, 20 (1976)
- 6) Masters, B. S. S., Williams, C. H., and Kamin, H. : *Method in Enzymology*, **10**, 567 (1967) Academic press.
- 7) Omura, T., and R. Sato : *Method in Enzymology*, **10**, 556 (1967) Academic press.
- 8) Innami, S., Nakamura, A., Miyazaki, M., Nagayama, S., and Nishiide, E. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 409 (1976)
- 9) 武藤泰敏 : 代謝, **10**, 884 (1973)
- 10) Dent, J. G., Netter, K. J., and Gibson, J. E. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **38**, 237 (1976)

(受付: 昭和52年7月31日)