

1. 緒言

近年、微量元素の生体作用が明らかにされ、その動態が改めて注目されるようになった。しかし正常人における体内含有量、出納など、栄養素としての微量元素の動態を把握する上で基礎となるデータが乏しく、特に我国では栄養素としての所要量などは全く定められていない。その理由のひとつに測定対象や測定法が標準化されていないことがある。一方、近年微量元素の測定技術が著しく進歩し、安定的、高精度でなおかつ簡便な測定法を探ることは今後の栄養研究にとっても意義のあることと思われる。我々は、近年注目を集めている2種の元素、セレンとモリブデンの血清含有量の簡便な測定法の開発を試みた。

2. 原子吸光分析

金属並びに金属類元素の定量には、原子吸光法(AAS)、誘導結合プラズマ発光(ICP-AES)、同質量分析法(ICP-MS)、中性子放射化分析法(NAA)、分光光度法、クロマトグラフィー法など、様々な方式が考案、実用化されている。このうち、AASは最近新しいフレームレス炉の開発、バックグラウンド補正やデータ処理のコンピュータによる自動化などの改良が加えられ、装置が比較的安価なこともあって一般に普及し、検出精度の点でも生体試料中の微量金属元素の定量に最適と思われる。

血清は液状の有機混合物で、標的要素抽出の際に種々の元素、微細粒子、有機分子等を処理する必要がある、添加物による汚染や標的要素含有物の散逸が起こりうるので、操作は可能な限り単純であることが望ましい。こういった点を考慮し、黒鉛炉加熱法(GFAAS)を選んだ。この方式は液状検体の処理に適し、試料採取、前処理、共存物質の除去、目的元素の定量が比較的簡便な操作でかつ自動的に行える。ただし同法には試料中の混在物質によるバックグラウンド吸収という欠点もあるので、ゼーマン効果を用いた補正を行う機材を使用した。

試料は炉中に導入、加熱されて100°C付近で蒸発乾固し、次いで温度上昇により有機物等が酸化、除去される(灰化)。さらに温度上昇により、標的要素が原子化されて吸光分析にかけられる。試料には表-1に例示する化学的修飾剤を添加して灰化/原子化を容易にし、混在物質による妨害を小さくするよう工夫する。

表-1. 化学的修飾剤/効能、Se/Moへの候補添加剤

Pd, Ni, Rh, Mn	合金化により目的元素の気化損失を防止
Mg(NO ₃) ₂ , NH ₄ NO ₃ , H ₂ SO ₄ , EDTANH ₄	塩化物の生成による目的元素の気化損失を防止
アスコルビン酸, 酒石酸, 琥珀酸	灰化段階で目的元素を金属まで還元
K ₂ S ₂ O ₈ , KMnO ₂ , K ₂ Cr ₂ O ₇ , O ₂	灰化段階で有機金属化合物を還元
7つ化化合物	有機金属化合物中の金属-炭素間の結合を切る
Mo, Ti, V, Ca, La, Al	原子化しにくい炭化物の生成を抑制
Se :	硝酸塩(Pd, Mg, Ca, Ni, Sr, Cu), K ₂ S ₂ O ₈ , アスコルビン酸, O ₂
Mo :	Pd, Mg, BaF ₂

3. セレン

セレン（セレンウム、Se）は生物学では微量元素と同等に扱われることが多いが、硫黄と同族の低沸点の両性元素である（表-2）。生体のセレンの定量には血清、尿、毛髪を用いた原子吸光分析、中性子放射化分析が利用され、セレン欠乏の評価法として血漿や血球のグルタチオンペルオキシダーゼ活性が測定される。

表-2. セレンの特性

原子量	78.96
配位数	6
融点	218°C
沸点	684°C
供給元	土壌、穀物
生体内存在形式	セレンアミノ酸（セレノシステイン、セレノメチオニン）
セレン含有蛋白質	グルタチオンペルオキシダーゼ（哺乳類の血球、肝臓） 他のセレン含有蛋白質（生理的意義不明）
欠乏症	冠動脈疾患、克山病、カシンベック病

4. セレンの測定条件設定

溶液中でセレンを水素付加還元し、生成した水素化物の気体を原子化すると、高感度の測定が可能で（水素化物発生法）よく用いられるが、この方式は反応経路が複雑で検体処理が煩瑣である。今回は感度は多少犠牲にしても簡便性を追求し、黒鉛炉加熱法で添加修飾剤と加熱プログラムを工夫することで至適条件を求めた。

測定感度を上げるには検体処理温度を上げて血清中の有機物を可能な限り除去し、バックグラウンド吸収を抑えるのが常道である。しかしセレンには沸点が低く、温度が上昇しすぎるとそれ自体が散逸するという、原子吸光に不向きな特性がある。

図-1に灰化温度の、図-2には灰化時間の信号・バックグラウンドへの影響を示す。修飾剤として、①修飾剤なし、②硝酸マグネシウム添加、③硝酸マグネシウム+硝酸ニッケル添加、④硝酸マグネシウム+硝酸ロジウム添加、を比較した。4倍希釈血清を試料として最も高い灰化温度と吸収度の得られたのは④で、バックグラウンドが極小になる灰化温度は750°Cであった。そこで750°C 250秒という低温・長時間加熱という折衷的手法を選択し、表-3、表-4に示す条件下で標準添加法により測定した（図-3）。

表-3. 血清セレン測定条件

機材：	フレイムレス原子吸光装置（Perkin-Elmer 4100ZL）
方式：	黒鉛炉加熱法 （バックグラウンド補正：ゼーマン効果法）
サンプル：	血清（超純水4倍希釈）
灰化温度、時間：	750°C 250秒
化学修飾剤：	Mg(NO ₃) ₂ 5μg + Rh(NO ₃) ₂ 3μg
検量法：	標準添加法

表-4. 血清セレン測定プログラム

ステップ	温度 (°C)	加熱 (秒)	保持 (秒)	ガス流量(アルゴン mL/分)
乾燥 1	95	5	15	250
乾燥 2	120	5	50	250
灰化	750	5	250	250
原子化	2400	0	4	0
清掃	2600	10	4	250

5. モリブデン

モリブデン (Mo) は第二遷移元素に属し、多様な酸化数 (最大 6) をとる微量元素である (表-5)。生体のモリブデンは主に細胞内に存在する多数の酵素の補因子または構成成分となっていて、血球や肝臓に多く含まれる。血漿中に存在するものの生理的意義は不明であるが、摂取量の減少後早期に低下する。欠乏症として亜硫酸オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ活性の低下に続発する代謝異常が数多く報告されている。

表-5. モリブデンの特性

原子量	95.95
配位数	6
融点	2,620°C
沸点	3,700°C
比重	10.2
供給元	土壌、穀物
存在形式 (血清含む)	タンパク結合? エナメル質
モリブデン含有蛋白質	フラボ蛋白 (キサンチンオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ) ヘム蛋白 (亜硝酸オキシダーゼ)
欠乏症	高メチオニン血症、銅中毒

6. モリブデンの測定条件設定

血清を直接試料として用いると、血清蛋白による妨害が強く効率のよい吸収信号を得るのが困難と思われ、当初、10%トリクロロ酢酸で血清蛋白を除去し、上清中のモリブデンの定量を試みた。しかし検体処理が煩雑なことに加えて、血清中のモリブデンの大半が蛋白結合型であるために除蛋白の過程で一部は失われ、残りは上清中に再分布して誤差要因となる結果、測定値の生理的意義が著しく損なわれることが判明した。

そこで血清を直接試料として測定することとした。モリブデンが耐火金属であるという特性は灰化には有利な一方、高温での化学干渉の除去が問題になる。まず、蛋白を含まないモリブデン溶液を、①修飾剤なし、②硝酸マグネシウム単独添加、③硝酸鉛+硝酸マグネシウム混合添加、④フッ化バリウム添加、の各条件下で測定したところ、④で灰化温度を1700°Cまで上げることができた。図-4にフッ化バリウム添加量の、図-5に灰化温度の信号・バックグラウンドへの影響を示す。これを血清試料に適用して標準添加法を行ったところ、化学干渉の強度も約5.8%と比較的低値であったので測定に用いた (表-6、表-7)。試料導入と灰化のための加熱を繰り返す行程により、含有量の乏しい血清中のモリブデンを濃縮した。フッ化バリウム添加下標準添加法と絶対検量線法では検量線がほぼ平行になったので、検量線法で測定した (図-6)。

表-6. 血清モリブデン測定条件

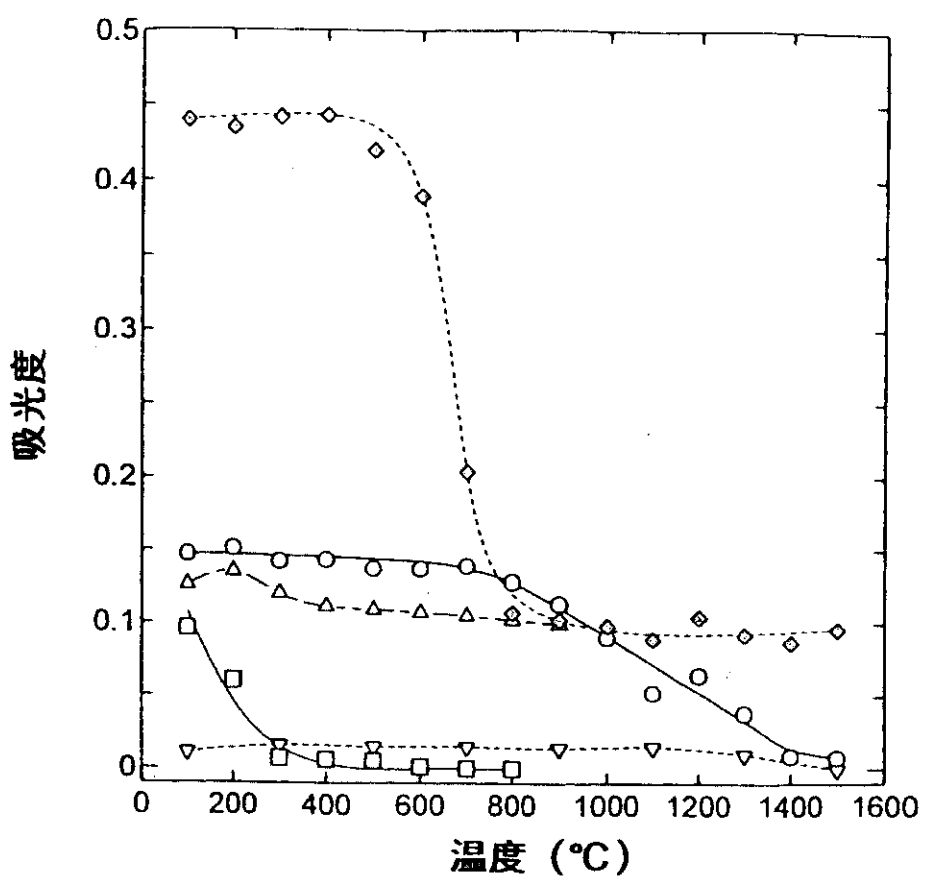
機材:	フレイムレス原子吸光装置 (Perkin-Elmer 4100ZL)
方式:	黒鉛炉加熱法 (バックグラウンド補正:ゼーマン効果法)
サンプル:	血清 (0.2%硝酸3倍希釈)
灰化温度、時間:	600°C 30秒 + 1700°C 30秒
化学修飾剤:	BaF ₂ 5μg
検量法:	絶対検量線法

表-7. モリブデン測定プログラム

ステップ	温度 (°C)	加熱 (秒)	保持 (秒)	ガス流量(アルゴン mL/分)
乾燥1	100	2	30	250
乾燥2	130	2	30	250
灰化1	600	15	30	250
灰化2	1700	15	30	250
原子化	2600	0	6	0
清掃	2600	1	2	250

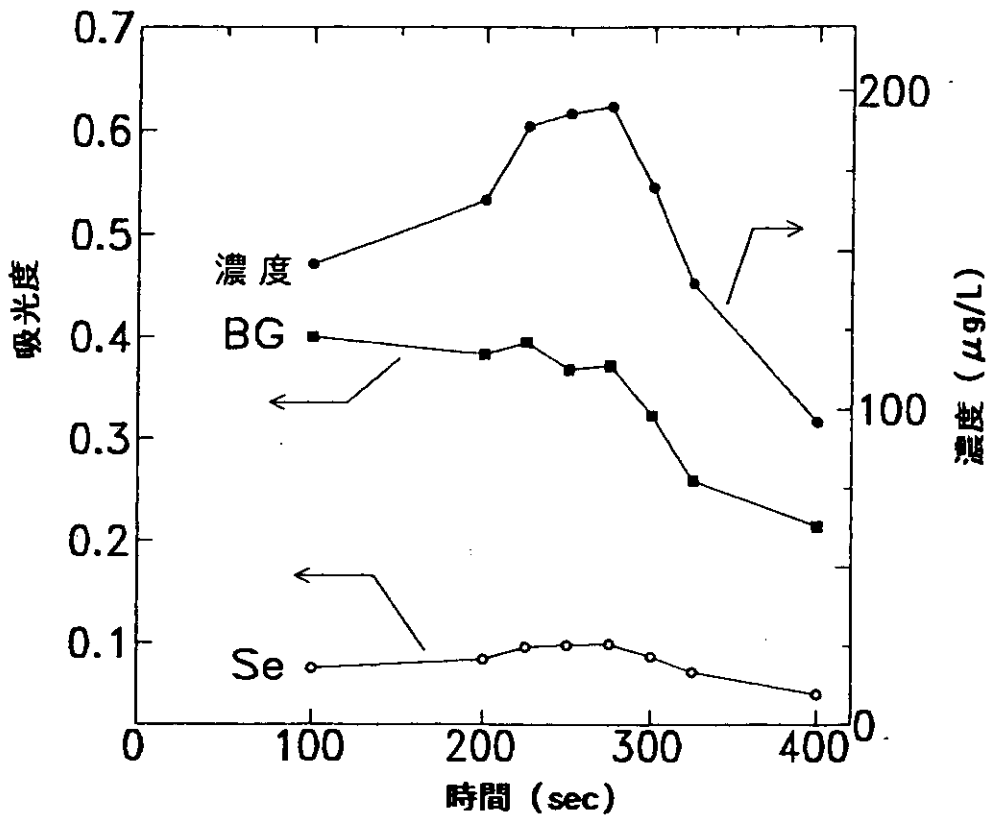
7. ヒト血清中セレン、モリブデン測定値

健常ボランティア (男女、年齢9-63歳) からの採血により1時間室温静置後、3,000rpm 15分遠心分離した血清を測定に供した。年齢、性別と測定値の関係を図-7 (セレン、男14名、女33名) と、図-8 (モリブデン、男4名、女10名) に示す。測定結果は、特に欠乏も過剰もない健常者であり、これまでの研究等に見られる健常対象者で、他の方法での測定結果とほぼ同等である。対象群が小さく、また選択上のバイアスもあるため、正常値もしくは、この方法の標準値としての評価はより一般的な母集団からの無作為選択検体をより多く測定すべきである。また、欠乏や過剰など際の血清値の変動やその適切な測定が可能かどうかの検討はまだ行えないが、本法が定量法として実用可能であることは示されたと考える。



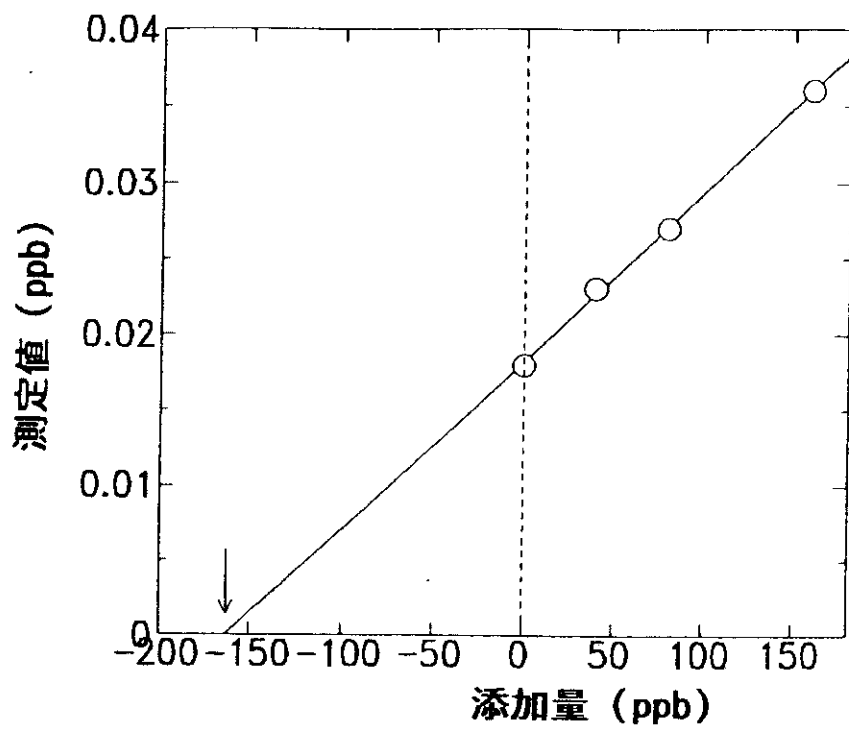
セレン：灰化温度と修飾剤の影響

(□)修飾剤なし ; (▽)Mg(NO₃)₂ ; (△)Ni+Mg(NO₃)₂
(○)Rh+Mg(NO₃)₂ ; (◆)バックグラウンド



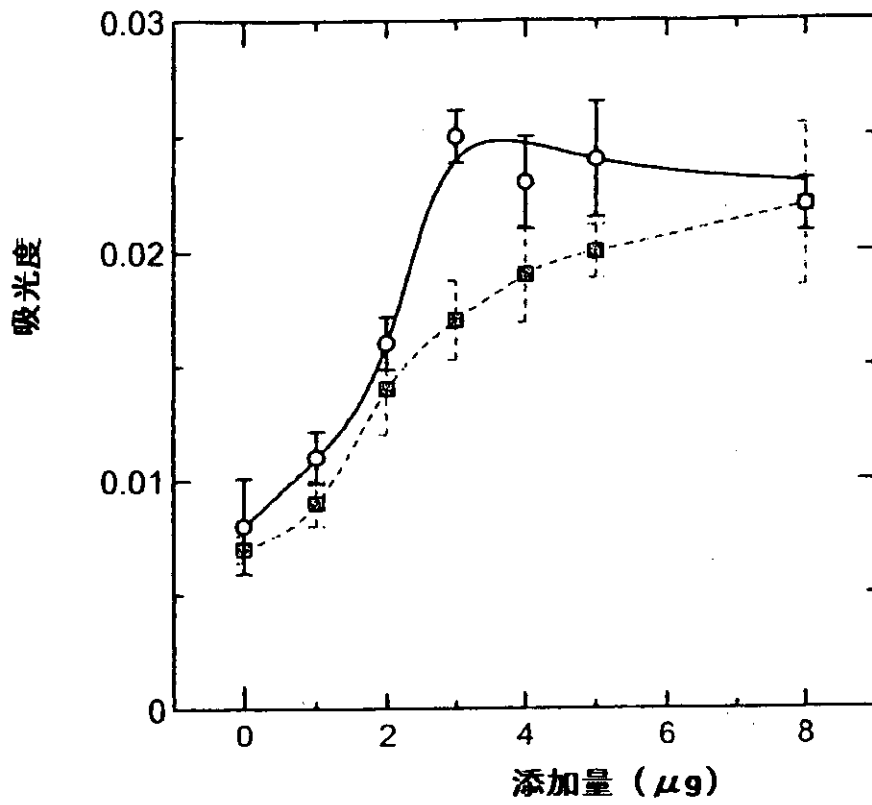
セレン：灰化時間の影響 (750°C)

図-3



セレンの標準添加曲線

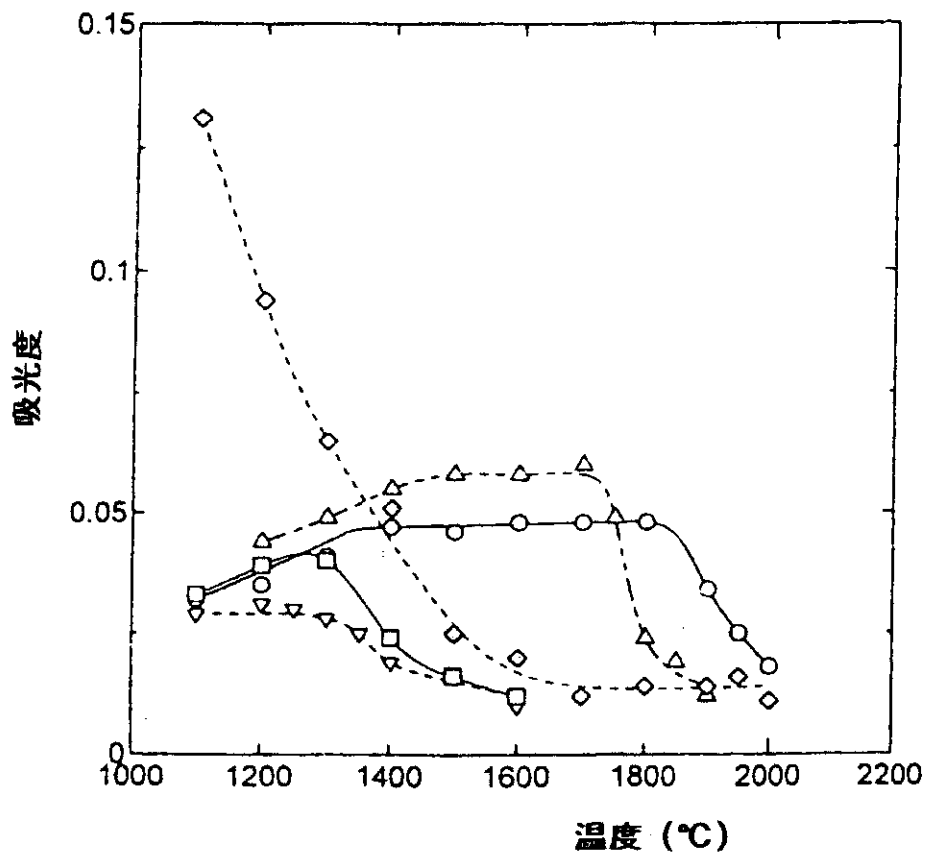
12-4



モリブデン：フッ化バリウム添加量の影響

(-○-)Analyte signal : (-■-)Background signal

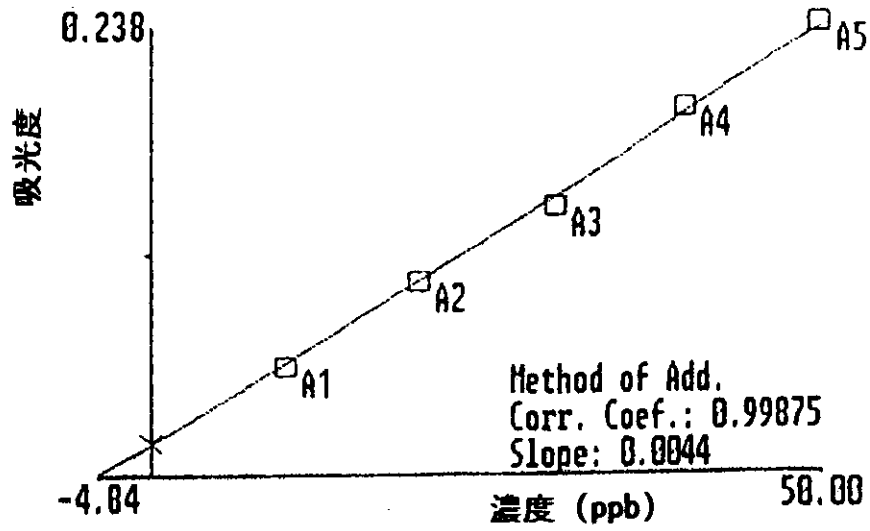
図-5



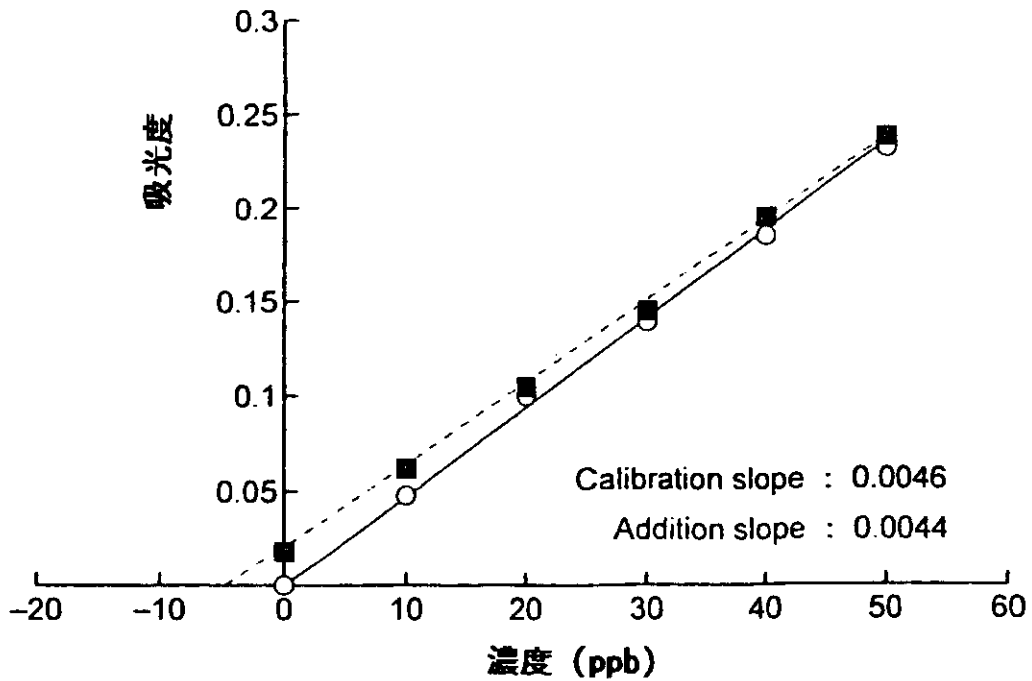
モリブデン：灰化温度と修飾剤の影響

(□)修飾剤なし ; (▽)Mg(NO₃)₂ ; (△)BaF₂
(○)Pd+Mg(NO₃)₂ ; (◇)バックグラウンド

(2) - 6



モリブデンの標準添加曲線



モリブデンの絶対検量線と標準添加曲線

図-7

血清tLp濃度(ppb)

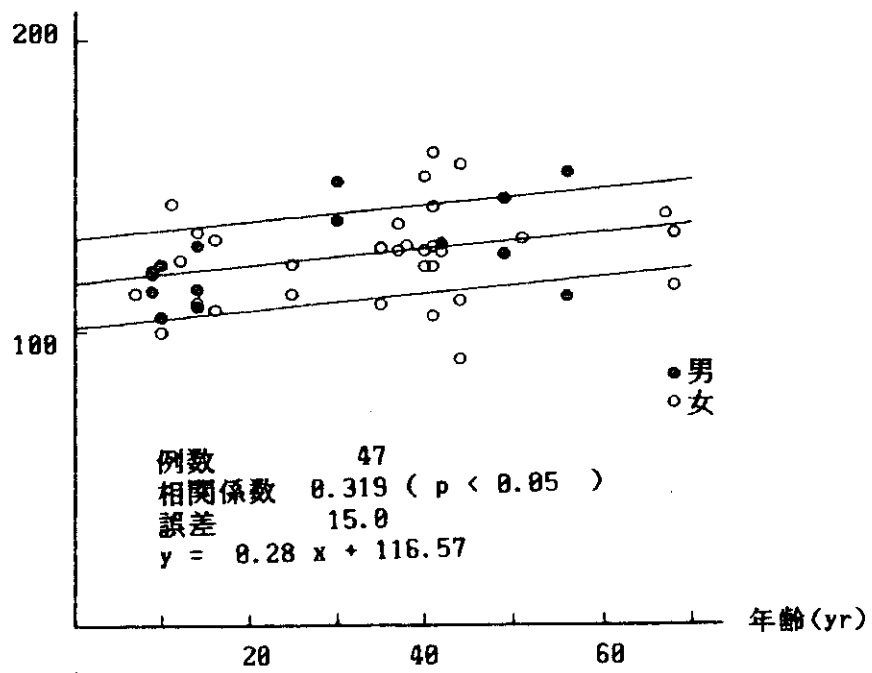
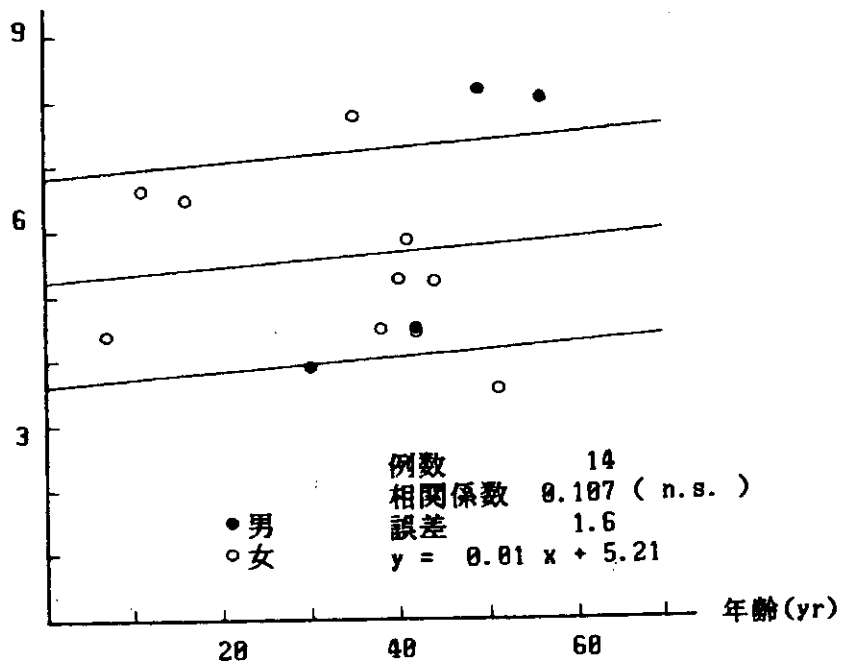


図-8

血清モリブデン濃度(ppb)



ビタミンの安全性に関する研究

—新生児期のビタミン E 同族体の動態—

研究要旨 ラット新生児期においては血漿中 α -Toc/ γ -Toc 比は生直後から 14 日まで、増加するが、この時ラット肝細胞内特異的輸送タンパク質 α -tocopherol transfer protein (α TTP) のタンパクの発現は生直後は弱く、次第に増加した。これは血漿中 α -Toc/ γ -Toc 比と対応していた。

分担研究者 美濃 真 清恵会病院院長

A. 研究目的

α -Tocopherol (α TTP) を多く含む母乳で栄養されていると乳児の血漿中 α -Toc/ γ -Toc 比は約 10 倍と高いが、 α -Toc を多く含む人工乳で栄養されていると、この比は約 2.8 倍と α -Toc 選択性は悪くなる。成人では γ -Toc を多く含む食餌を摂取しているが、この比は変わらず約 10 倍程度である。この理由として、新生児期における α -Toc を選択的に輸送する α TTP 量あるいは質的未熟性が考えられる。したがって、新生児期にビタミン E を投与する際に α -Toc の吸収は制限され、さらにオーバーフローした α -Toc による腸管内での高浸透圧による傷害が予想される。そこで基礎的研究として新生児ラットを用いた α TTP の発達的变化について検討した。

B. 研究方法

a) SD 系雄ラットを 0、4、14、28 日および 12 週間後に肝臓および血液を採取し実験に供した。

b) α TTP タンパク発現 (Western Blot Analysis)

エーテル麻酔を施したラットを断頭後、開腹し肝臓を buffer A(0.25M sucrose, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.4) にて灌流し取り出し、速やかに細切し、2.3 容の buffer A を加えてホジェネイトした。ホモジェネイト液を 10,000G にて 60 分間遠心し細胞質画分を調整し、SDS-PAGE を行いニトロセルロース膜に転写後、この膜を抗 α TTP モノクローナル抗体を用いて Western blotting を行い、洗浄後アルカリフォスファターゼと結合したヤギ抗マウス 2 次抗体と incubate させ発色バッファーにて発色させた。2 次抗体および発色バッファーは Bio-Rad 社製のものを用いた。

c) 血漿ビタミン E の測定

6 時間の絶食後にヘパリン加採血し遠

心して得た血漿 0.5ml を褐色スピッツにとり、0.27mM の EDTA を含んだリン酸バッファー、6%ピロガロールエタノール溶液を 0.5ml 各々加える。内標物質として 0.2%トコロールエタノール溶液を 1ml 加え振盪する。60%KOH を 0.2ml 加えケン化した後ヘキサンにて抽出しエバポレーションした後エタノールに再溶解し、電気化学検出器を装着した HPLC にて α 、 γ -トコフェロールを測定した。HPLC 条件はカラム:IRIKA RP18 (250X4mm)、移動相:メタノール/水/ NaClO_4 (1000/2/7, v/v/w) である。

C. 結果

a) 生直後からの血漿中 α -Toc および γ -Toc 量の変化

図-1 に示すごとく、離乳が開始される生後 14 日までは血漿中 α -Toc は増加を続け、 γ -Toc はあまり変化はなかった。図-2 には α -Toc/ γ -Toc 比を示すが、ここでは生後 14 日までその比は増加を続け、選択性の向上が認められる。

b) 生直後からの肝臓中 α TTP の変化

図-3 に示すごとく、日齢に応じて α TTP 蛋白発現量は増加していった。

D. 考察

α -Toc と体内への取り込み過程において、まず、第一のステップは小腸上皮における吸収である。その後、キロミクロンとともに大循環系に入った後は、肝臓内において LDL に組み込まれて血中へ再放出される。第2のステップは肝臓における特異的 α -Toc 輸送と考えられるが、このステップはラット新生児期は α TTP の未成熟のため、選択性はよくないため比較的多くの γ -Toc が血中に入ることになる。大量に投与された場合、 α -Toc は VLDL や LDL に組み込まれるものは多くはないため、キロミクロンのまま血中に長くとどまるか、他のビタミン E 同族体とともに胆汁中に排泄されると考えられる。ヒトでは未熟児網膜症や肺異形成症に対する治療を目的に α -Toc を投与することがあるが、この胆汁に排泄された α -Toc および経口摂取された α -Toc は高浸透圧を示すと、壊死性腸炎の原因となり得るため注意が必要である。ビタミン E の大量投与の安全性に関して体内濃度を規程する α TTP から検討を行うことは今後重要性が増すものと考えられる。

E. 結論

新生児ラットにおいて α TTP 蛋白は生直後は発現は弱く、次第に増加してくる。これに伴って γ -Toc は不変であるが、

血漿中 α -Toc は増加した。

F. 研究発表

1. 論文発表

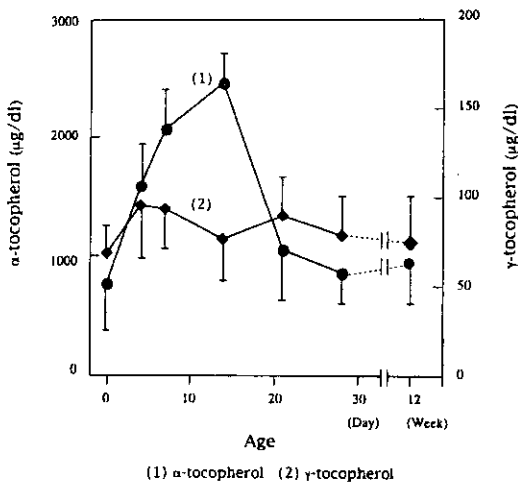
Kim, H-S., Arai, H., Arita, M., Sato, Y., Ojihara, T., Tamai, H., Inoue, K., Mino, M. (1996) Age-related changes of α -tocopherol transfer protein expression

in rat liver. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 42: 11-18

2. 学会発表

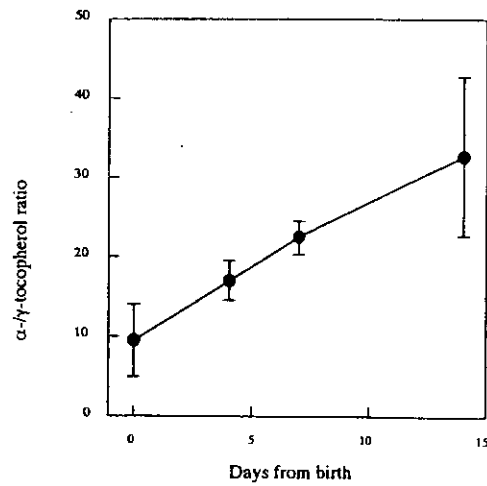
Tamai, H., Mino, M. (1998) Vitamin E Status in Neonates. 1st China-Japan International Conference on Vitamins, 1998, April 15-17, Beijing

図-1



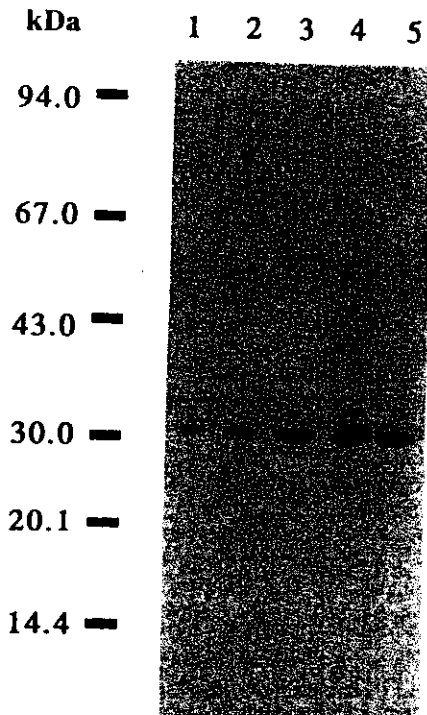
(1) α -tocopherol (2) γ -tocopherol
Changes of plasma tocopherols in rats after birth.

図-2



Changes in the discrimination of tocopherols during the suckling period. Discrimination between tocopherols was investigated by calculating the plasma α -tocopherol to γ -tocopherol ratio. The ratio showed linear increase during the suckling period.

図-3



Changes of hepatic α -TTP expression in rats after birth. Cytosolic fractions (50 μg of protein) were obtained from rat liver, on day 0 (lane 1), day 4 (lane 2), day 14 (lane 3), day 28 (lane 4), and week 12 (lane 5) of life. The sample were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter.

血液透析患者におけるビタミンEの安全性に関する研究：
ビタミンE、ビタミンCの血中酸化LDLに及ぼす影響

分担研究者 湯川 進 和歌山県立医科大学第三内科 教授
研究協力者 宗 正敏 同 助教授
大谷晴久 同 講師

研究要旨 血液透析患者（透析患者）においては酸化ストレスが亢進していると報告されているが、ビタミンE（VE）、ビタミンC（VC）の影響は十分に解明されていない。今回、我々は、透析患者の血漿酸化LDLを測定し、VE、VCの影響を検討した。対象はVE投与中（ニコチン酸トコフェロール400～600mg/日）の患者6例（E群）と非投与患者6例（N群）であり、両群共、VCを投与していた（アスコルビン酸100mgを週3回静注）。E群の血漿酸化LDLは 0.415 ± 0.071 [ng/5 μ gLDL]でN群（ 0.352 ± 0.125 ）とは有意な差を認めなかった。両群共にVC投与を3ヶ月中止したところ酸化LDLは増加したが、E群での増加が特に顕著であった（E群： 5.49 ± 5.75 、N群： 1.202 ± 0.255 ）。その後、さらに、E群でVE投与を3ヶ月中止したところ（VCも中止したままで）、酸化LDLは 0.967 ± 0.150 と低下した。以上の結果より、透析患者においては、VC非投与時には、LDLの酸化が亢進しており、VEの単独投与は、むしろ酸化LDLを増加させ、VC投与はそれを抑制するということが示唆された。

A. 研究目的

慢性血液透析患者（透析患者）においては酸化ストレスが亢進していると報告されている¹⁾²⁾が、抗酸化ビタミンであるビタミンE（VE）、ビタミンC（VC）の影響は十分に解明されていない。我々は、板部ら³⁾⁴⁾が確立した血中酸化LDL定量法を用いて透析患者の血漿酸化LDLを測定し、VE、VCの影響を検討した。

B. 研究方法

i) 対象

対象はVE（ニコチン酸トコフェロール 400～600 mg /日）を6ヶ月以

上投与中の透析患者6例（E群：男2例／女4例、平均年齢 61.5 ± 15.7 歳、透析歴 6.3 ± 5.8 年）とVE非投与透析患者6例（N群：男1例／女5例、平均年齢 60.2 ± 9.0 歳、透析歴 7.1 ± 7.1 年）。両群共、一年以上VC（アスコルビン酸 100 mgを週3回透析終了時静注）を投与されていた。

ii) 方法

VCあるいはVE投与の影響を検討するため、VC、VEを順次中止して血中酸化LDLの変化を検討した。すなわち下記のプロトコールの様に、両群共にVCを中止し、3ヶ月後に酸化LDL値を測定し、更にVE群はVEを中止して3

ヶ月後に酸化LDL値を測定した。

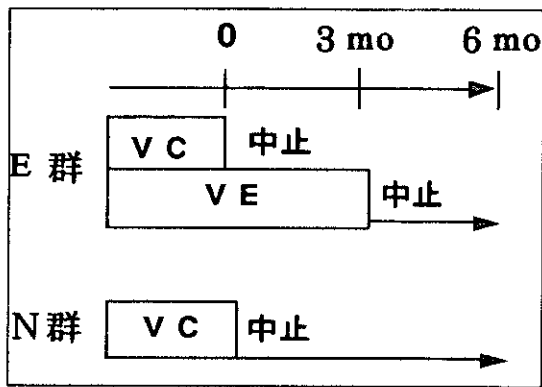


図1. 研究プロトコール

C. 研究結果

研究開始時の血漿 α -Tocopherol (α -Toc) 濃度はE群はN群に比べて有意に高値であった。

図2に示す様に、研究開始時のE群の血漿酸化LDLは $0.42 \pm 0.07 \text{ ng}/5 \mu \text{ g LDL}$ でN群 ($0.35 \pm 0.13 \text{ ng}/5 \mu \text{ g LDL}$) とは有意な差を認めなかった。VC投与中止3ヶ月後、両群共に酸化LDLは増加したが、E群の増加が顕著であった (E群: $5.49 \pm 5.75 \text{ ng}/5 \mu \text{ g LDL}$ 、N群: $1.20 \pm 0.26 \text{ ng}/5 \mu \text{ g LDL}$) (図2)。その後、さらに、E群でVE投与を3ヶ月間中止したところ (VCも中止したままで)、酸化LDLは $0.97 \pm 0.15 \text{ ng}/5 \mu \text{ g LDL}$ と低下したが、VE・VC投与時よりは高値であった (図2)。

また、血漿 α -Toc濃度は、VC投与中止後E群では低下した。N群でも血漿 α -Tocは3ヶ月後には低下したが、6ヶ月後には、ほぼ前値と同程度であった (図3)。

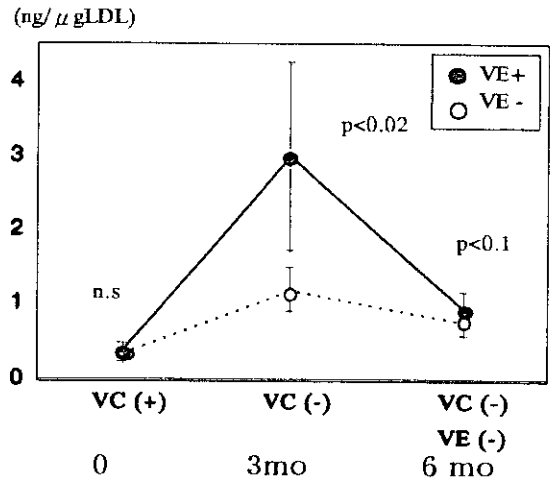


図2. VC,VE中止後の血漿酸化LDLの経過

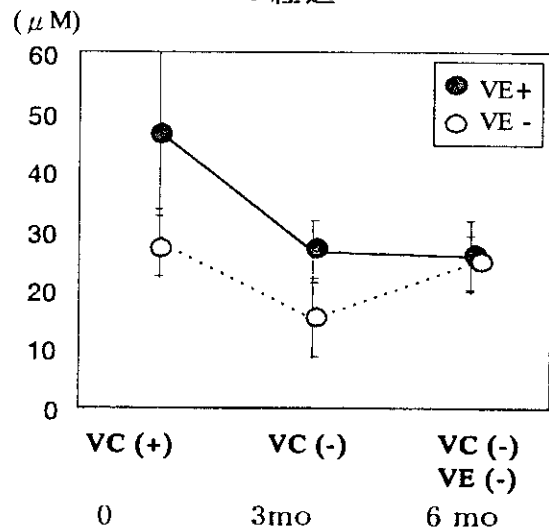


図3. VC,VE中止後の血漿 α -Tocの経過

D. 考察

透析患者においては、水溶性のビタミンであるVCは透析操作で失われると報告されており⁵⁾⁶⁾、また、高カリウム血症の予防のため、野菜や果物の摂取が制限されていることから、VC欠乏に陥りやすいとされている。今回は、血漿中VC濃度の測定はできていないが、VC投与を3ヶ月間中止することにより、VC欠乏状態になっていた可能性がある。

このことから、VCがLDLの酸化を

防いでいることが示唆される。また、VC欠乏状態では、VEはむしろLDLの酸化を促進する可能性が示唆された。

VEが、ある条件下ではLDLの酸化を亢進させるという α -Tocopherol Mediated Peroxidation (TMP) 説⁷⁾が提唱されているが、今回の結果はこの説を支持する結果と考えられる。

今回の検討は、すでに投与されていたVC、VEを中止して検討を行ったものであり、投与前の血漿酸化LDL値がどうであったかは推測の域を出ない。今回の結果を確かめるために、元々VC、VEを投与していない透析患者でのProspectiveな研究が必要であろう。

E. 結論

透析患者においては、LDLの酸化予防にVCが重要な役割を果たしており、またVEは、VC欠乏状態では、むしろ血漿酸化LDLを増加させる可能性が示唆された。

[文 献]

- 1) Maggie E, Bellazzi R, Falaschi F, et al.: Enhanced LDL oxidation in uremic patients: An additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int* 45: 876-883, 1994
- 2) 湯川 進: 透析患者の脂質代謝異常—最近の知見を中心に—
*透析会誌*25: 87-92, 1992
- 3) Itabe H, Yamanaka H, Imanaka

- T, et al.: Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res* 37: 45-53, 1996
- 4) Itabe H, Takeshima E, Iwasaki H, et al.: A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 269: 15274-15279
- 5) Sullivan JF and Eisenstein AB: Ascorbic acid depletion in patients undergoing chronic hemodialysis. *Am J Clin Nutr* 23: 1339-1346, 1970
- 6) Ramirez G, Chen M, Boyce HW Jr, et al.: Longitudinal follow-up of chronic hemodialysis patients without vitamin supplementation. *Kidney Int* 30: 99-106, 1986
- 7) Bowry VW and Socker R: Tocopherol-mediated peroxidation. The pro-oxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *J Am Chem Soc* 115: 6029-6040, 1993

分担研究報告書

「ビタミンD及びKの Tolerable Upper Intake Level (UL)に関する文献的評価」

分担研究者 岡野 登志夫 神戸薬科大学衛生化学研究室 教授

研究要旨 ビタミンの安全性を考慮した Upper-Limit の設定に関して、これまで、詳細な検討はあまり行われていない。脂溶性ビタミンのうちビタミンDとKの Tolerable Upper Intake Level (UL) を評価する目的で、MEDLINE (PubMed) をデータベースとして文献調査を行った。DのULについては、高Ca血症を示さず血中25-D及び1,25-D濃度が正常範囲内であることを評価基準とし、Kは溶血性貧血や過ビリルビン血症、肝腫大、核黄疸などの過剰症を示さない用量を指標とした。その結果、DのULは50 µg/dayが適当であると判断した。Kは過剰症の報告がほとんどなく明確なULを導くことが困難であったが、15 mg/day以上の摂取は安全性に注意を要すると判断した。

研究協力者 津川 尚子 神戸薬科大学衛生化学研究室 講師

A. 研究目的

国民の栄養補給に対する関心が高まるなか、栄養所要量の抜本的な見直しや栄養補助食品に関する研究が数多くなされている。栄養所要量は正常な栄養状態を維持し欠乏症を予防するために必要であることとは言うまでもないが、一方その安全性を考慮したUpper-Limitの設定に関する詳細な検討はなされていない。ビタミンD (D) は、抗くる病因子として骨成長に重要であることが知られているが、過剰摂取により高Ca血症とそれに伴う悪心嘔吐、口渇、腎不全、筋無力、意識混濁などの中毒症状を惹起する。ビタミンK (K) は、血液凝固因子として乳児K欠乏性出血症の治療などに用いられてきたが、骨基質蛋白であるオステオカルシンがK依存性にγ-calboxylationされることが明らかになり、現在では骨粗鬆症治療薬としても使用されている。新生児、乳幼児に対するKの大量投与では、溶血性貧血、過ビリルビン血症、肝腫大、核黄疸な

どの過剰症を生ずるといわれる。本報告書では、D及びKの摂取量と過剰症の発現について文献検索を行い、両ビタミンのULについて評価検討した結果を報告する。

B. 調査方法

D及びKの文献調査において、MEDLINE (PubMed) をデータベースとして使用し、インターネット検索を行った。検索語として各ビタミン名と [Nutrition Policy] [Nutritional Requirement] [Dietary Supplements] [Allowance] [Deficiency] [Excess] [Overdose] [Toxicity] [Upper-limit] [Human] 等を組み合わせて検索した結果、Dで643件、Kで705件の文献がヒットされた。これらの中から、ULの設定に必要なと思われる文献を選出した。Dには活性代謝物である1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-D) があり、1,25-Dは骨疾患の治療薬としてしばしば用いられる。しかし、今回の調査はDの栄養学的安全性を評価する

ことが目的であるため、1,25-Dではない「D」のULについて調査した。天然に存在するKは側鎖構造の異なるK1とK2に大別され、主にこの2種が経口摂取される。合成品で家畜の餌に添加されるK3は、獣肉食品に残存することが問題となることがあるが、本調査ではK1、K2についてのみ評価を行った。

ULは、通常副作用非発現量（NOAEL）を不確定要因（UF）で除することにより算出される。米国ではDに対する成人のUFを1.2、小児では1.8を設定している。しかし、わが国ではUFが設定されておらず、現在のところD及びKのUL算出に用いる数値がない。従って、今回の調査ではAdequate Intake（AI）に基づくTolerable Upper Intake LevelをULとして評価した。

C. 調査結果

1. ビタミンD

Dの典型的な中毒症状は高Ca血症である。Dの過剰症は、Dの脂肪組織への蓄積とその代謝物である25-hydroxyvitamin D（25-D）の筋肉への蓄積が原因となり、数カ月間持続的に徐放されることにより起こると考えられている。また、活性型である1,25-Dよりもむしろ血中25-D濃度が非常に高くなることが問題とされている。また、重篤なD過剰症では体内で厳密に濃度調節されるべき血中1,25-D濃度も長期間にわたって上昇することが報告されており¹⁾、D補給量と血中Ca、25-D、1,25-D濃度の関係を中心に評価検討を行った。

まず、成人に対する投与例を示す。授乳中の母親に30 µg/dayのDを4週間投与した場合、血中25-D濃度は36 ng/mlで高Ca血症は見られない²⁾。閉経初期の健常女性29例に対してD₃ 50 µg/dayとCa 500 mg/dayを12ヵ月投与した場合、血中25-D濃度は48 ng/ml、1,25-D濃度は30 pg/mlで、血中Ca濃度は正常値を示す³⁾（Table 1, 2）。また、

Himmelsteinらも健常老年女性30例に同用量のD₃を6週間投与したが、高Ca血症は観察されず、血中25-D濃度は32 ng/ml、投与開始時から変化しなかった（Table 3, Fig 1）⁴⁾。血中25-D濃度の正常範囲は各施設によって若干異なるが、10–80 ng/ml⁵⁾とされおり、50 µg/dayの投与では血中D代謝物濃度、Ca濃度ともに正常値を示すといえる。一方、ビタミンD強化牛乳によるD過剰症の例として、72歳女性が725 µg/dayのD強化牛乳を摂取したとき、血中25-D濃度は310 ng/ml、Ca 11.7 mg/dlとなり、正常域を越える25-D濃度と軽度の高Ca血症が見られた⁶⁾。また、77歳女性に対して、D 1250 µg/day、Ca 500 mg/dayを6日間経口摂取させると重度の高Ca血症（21 mg/dl）を生じた⁶⁾。小児に対してD欠乏治療の目的でD₃ 42.5あるいは100 µg/dayを1–10週間投与した場合、血中25-D濃度はそれぞれ6.8、14.8 ng/ml、血中1,25-D濃度は50.3、153.0 pg/mlとなった⁷⁾。この場合、100 µg/dayの投与では血中25-Dには問題ないが血中1,25-D濃度が正常値上限に近くなる。Chesney⁸⁾は、DのULとして2.5 µg/100 kcalが適当としている。成人のエネルギー所要量が2000–2500 kcal/dayとした場合、1日あたり50–62.5 µgがDのULに相当する。Omaye⁹⁾は「大量のビタミン補給による治療の安全性」と称する総説で、Dの急性中毒量は25–75 µg/kg/day（体重60 kgの場合：1,500–4,500 µg/day）、慢性中毒量を250–12,500 µg/dayとしている（Table 4）。

2. ビタミンK

Kの補給は、乳児のK欠乏性出血症や抗生物質によるK再生系酵素阻害によるK欠乏に対して行われることが多い。最近では、骨粗鬆症治療を目的とした利用も行われている。米国におけるKのRDAは、1 µg/kg/dayとされているため、体重60 kgの場合60 µg/dayとなる。KのULを検討するため、この摂取量以上の補給が行わ