

1. はじめに

微量元素の栄養学において測定法の重要性に対する認識が高まりつつある。昨年来我々はグラフアイト炉原子吸光 (GF-AAS) 法による血清のセレンとモリブデン簡便測定法の開発を試みている。引き続き今年も原理面・実用面での得失を分析し、技法上の改良の余地の有無について検討した。

2. 本年度の検討課題

セレンとモリブデンは人体生理学的に見ても、例えば血清中の濃度、機能、存在様式など、特性に著しい差異がある。昨年の経験から我々は原子吸光法を行う上でも試料の調整、灰化、原子化・吸光部などにおける挙動の差を認識し、測定信頼性を高めるには技法上の問題にさらに立ち入る必要を感じた。栄養学上の主な関心は検体中濃度の値そのものであり、欠乏過剰のいずれを扱うかの違いはあっても、2桁程度の有効数字が得られれば略満足でき、測定の安定性・再現性を重視する一方、格別高い測定精度を要求するわけではない。もっとも誤差要因が測定原理そのものに関わっていれば、これを排除すべきであるのは当然である。以上の点を踏まえて技法の信頼性を確認する目的で、今年度の検討課題を、

1. 血清セレンGF-AASへの別種添加剤の修飾効果
2. AASによる血清中セレン測定値の信頼性・再現性
3. 血清モリブデンGF-AAS測定に対する種々のハロゲンアルカリ土塩の修飾効果
4. GF-AASによるモリブデン測定値の信頼性

の4点とした。ただし第3の点を検討した結果、昨年度測定に用いた条件が最適で、現状では最良の測定値を得ていたことが判明し、モリブデンの定量法には既に確立された基準法とでも言うべき方式がないことから、異なる測定技法にもどづくデータ比較は行わなかった。

3. 別種のセレン原子吸光添加剤

昨年は修飾剤として硝酸マグネシウム $5\ \mu\text{g}$ と硝酸ロジウム $3\ \mu\text{g}$ を添加した。この方式はセレンに対する干渉除去の点では優れているが、添加操作が煩雑であること、添加量が多くて試料調整時の誤差が増える危険があること、複数の修飾剤の添加により新たな干渉を生じる可能性も懸念された。そこで比較的高いマトリックス干渉除去効果が経験的に知られている修飾剤であるフッ化マグネシウムと硝酸銀の単独添によって、添加剤の数と量の減少を試みた。

マグネシウムと硝酸銀を用いた結果を図1、図2に示す。ともに $1\sim 6\ \mu\text{g}$ の添加によりセレン信号は増強された。ところがいずれの場合もバックグラウンド信号が予想外に強く、とくに硝酸銀単独添加では添加量の増加に伴ってバックグラウンドが増加することで、総体として干渉がむしろ増大する結果を招いた。セレン測定の灰化時には、セレン自体の喪失を防ぐため炉温を低目に抑える必要があるが、この温度では硝酸銀との反応生成物が完全に気化・飛散せず、添加量に応じて炉中に残留したものと考えられ、硝酸銀は添加剤として不相当であることが判明した。

フッ化マグネシウム単独添加では添加増に伴うバックグラウンド増加はなかったものの比較的多量の添加を要し、マグネシウム/ロジウム複合添加に比べてS/N比の点など格別の利得がなかった。いずれも従来のマグネシウム・ロジウム複合添加が優れていることを示す結果となった。

4. セレン測定値の信頼性

砒素やセレンのような両性元素は溶液中で水素付加還元され、気体状の水素化物を生成する。この気体を原子吸光計に導入測定するのが水素化物発生物原子吸光 (HG-AAS) 法で、環境・生体中に含まれるセレンを定量する標準的な方法とみなされている。純度が高い試料が検出部に導入されるために感度と精度の高い吸光信号が得られること、前処理を工夫することで固体状の検体や多量の挟雑物を含む検体が扱えるという長所を有する反面、反応系が複雑なため反応-検体導入用の付加装置と煩雑な検体処理を要し、測定対象の損失や汚染付加による試料誤差が検出精度の高さを相殺するという弱点がある。また検体要求量が多いので、検体が少量しか得られない場合に実用上の困難を伴う。

本研究は元来、感度と精度はある程度妥協してでも簡便性の追求に主眼を置き、上に記したようなHG-AAS法の弱点の克服も視野に入れていた。しかし、同法は一定量以上の検体を得られさえすれば信頼に足るデータを提供し、標準法として確立されてもいることから、技法の確立、実施時の問題点の洗い直し、データの比較検討等を目的として血清検体にも適用することとした。

血清を濃硝酸と過塩素酸とともに加熱溶解・濃縮し、塩酸・臭化カリウムと混和、還元し、塩酸・水素化ホウ素ナトリウムとの反応により水素化セレンを発生させた。試料調製法と測定条件を表1に示す。測定精度と効率を高めるためには、①血清中挟雑物の完全分解、②還元反応によるセレンの価数の統一(完全還元)、③水素化反応の速度と比率の最適化、④水素化物気体の完全回収、が必要であるが、標準検体を用いた測定において、表の条件によれば計算上の還元、回収率をほぼ100%近い値まで高めることは可能だった。ただし、1シリーズの吸光測定の試料を調整するためには最低0.5mlの血清を必要とした。

GF-AAS法とHG-AAS法で測定した同一検体のセレン濃度には図3の関係があり、検体数は少ないが比較的良好な相関が得られた。反面、一致度は不良で、GF-AAS法によるとHG-AAS法のそれより35%程度高い測定値を得ることになる結果となった。

表1. 血清セレン水素化物発生原子吸光法測定条件

機材	フレーム原子吸光装置 (Perkin-Elmer 4100ZL) フローインジェクションシステム (同 MS-FIAS-400)
サンプル	血清 0.5ml
分解	濃硝酸 2ml + 過塩素酸 1ml
還元	1.8mol・l ⁻¹ 塩酸 + 2.0% (w/v) 臭化カリウム
水素化ホウ素ナトリウム	0.2% (w/v), 4.5ml・min ⁻¹
塩酸	1.8mol・l ⁻¹ , 9.0ml・min ⁻¹
セル温度	900°C
キャリアガス	Ar 100ml・min ⁻¹

5. モリブデン測定に対するハロゲン化アルカリ土の修飾効果

昨年、フッ化バリウム添加GF-AAS法によって血清検体を直接用いたモリブデン定量が可能であることを示した。ハロゲンは試料中の有機物の分解を促進し、バックグラウンド信号を減少させるが、沸点の低いモリブデン塩を生成して測定対象の損失を招くという欠点もある。その際、アルカリ土金属が共存するとハロゲン化物の生成が抑制されることから、ハロゲンのアルカリ土金属塩はモリブデンの測定にあたっては理論上優れた修飾効果を有すると考えられる。そこで今回は同属の化合物を対象に、①金属とハロゲンの効力の差異、②他の至適な添加物の組み合わせ、を検討した。対象はカルシウム、マグネシウム、ヨウ素、臭素で、これらのフッ化物またはバリウム塩について至適条件とマトリックス干渉を検討した。

図4に添加量-吸光特性を示す。塩化バリウムは添加量の増加によりモリブデン吸収が低下しバックグラウンドが増加するという最悪の特性であったが、他のものも有意な修飾効果がないか、多少の効果が見られてもバックグラウンド吸光が強すぎるために実用には程遠い結果であった。図5と図6は灰化温度と吸光度の関係で、前者は金属を、後者はハロゲンを変えて見たものである。修飾剤のない場合に比べていずれも灰化温度を1600~1800°C付近まで上昇させることができるが、吸光度が小さい故にフッ化バリウムに比べてS/N比が低く不安定であった。比較のため、図7にフッ化バリウムを含むグラフ(今年のデータ)を掲げ、至適条件下でのシグナル形状を図8に示す。フッ素以外のハロゲンおよびマグネシウム添加では炉内反応の残渣物によると思われる残存信号とゼロレベル(基線)への復帰遅延が、カルシウム添加ではピークの鈍化が見られた。いずれも修飾剤として不適切かつ測定部における誤差を拡大する原因となりうる。最終的に昨日用いたフッ化バリウムの特性が最適であることが判明した。

6. 考察

微量分析においては、これまで主に検出限界を下げる方向へ最大の努力がなされ、もっぱら精度のみが追求されてきた。しかし、実用面をも考慮すると、①検体量の少なさ、②検体処理の簡便さ、③再現性・安定性、さらに④測定機器や材料の安価さ、もまた必要であらう。残念ながら現在、全てを満足する測定法は実現困難で、標準となる方式も確立されていない。我々は血清中のセレンとモリブデンの定量にあたって、可能な限り前処理を簡素なものにとどめる目的で黒鉛炉原子吸光(GF-AAS)法を適用し、①検体は希釈血清、②前処理は硝酸加熱、③修飾剤はセレンに硝酸マグネシウム+硝酸ロジウム、モリブデンにはフッ化バリウム、④セレンの定量化は標準添加法、モリブデンは絶対検量線法、という方式をとることにより、一定

の精度を維持しながら安定した測定が可能であることを確認した。

今回は測定条件、とりわけ添加修飾剤を工夫することで、より鋭敏で安定した結果が得られるかどうかを系統的に検討したが、結果的には昨年条件を上回る条件を見出すことはできなかった。ただ、血清検体に対する各修飾物質の成分の役割と挙動は明らかになり、セレンの定量については従来から標準法とされてきた水素化物発生（HG-AAS）法との比較の結果、昨年度の測定値は充分満足できるものであることが判った。GF-AAS法は検体要求量の少なさと検体処理の簡便性が最大の利点であり、とりわけ後者によれば検体処理時の試料誤差が減るために、総体として測定誤差を抑制することができることを考慮すると、GF-AAS法には大きな利点があると考えられる。

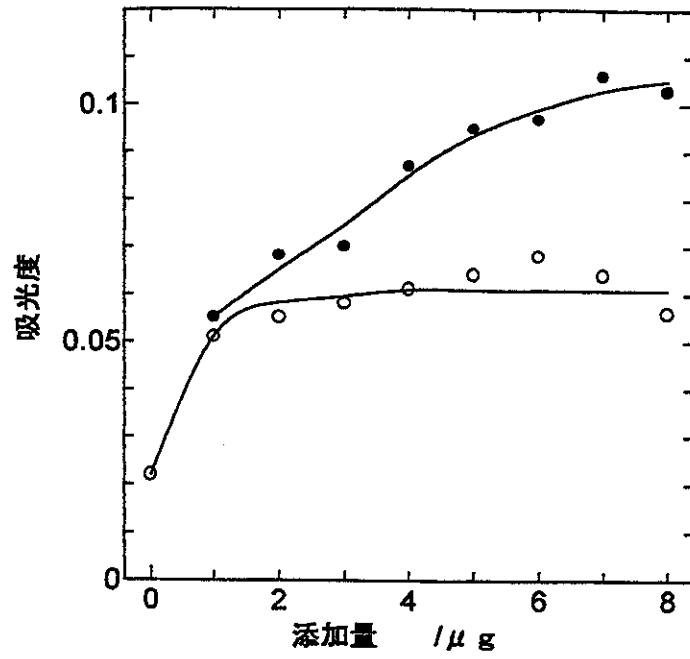


図1 AgNO₃添加 Se 吸光
(○:Se 吸収 ●:ハックラント)

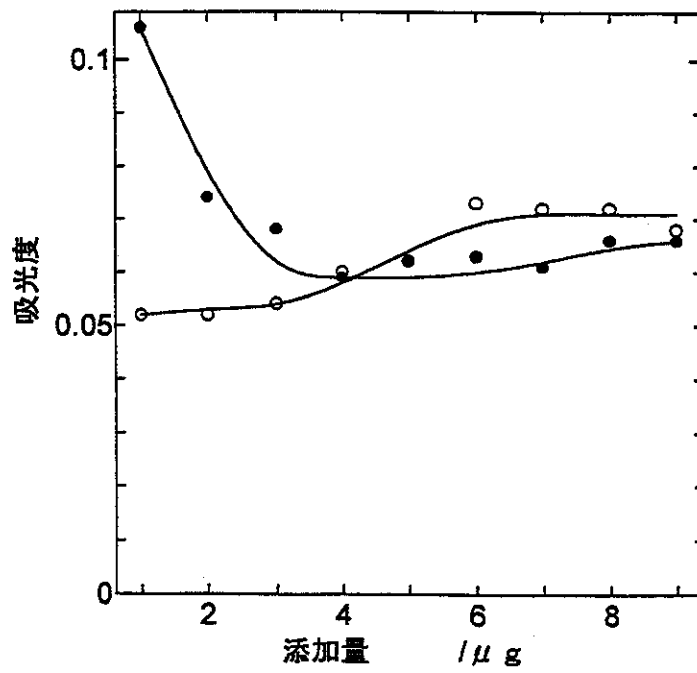


図2 MgF₂添加 Se 吸光
(○:Se 吸収 ●:ハックラント)

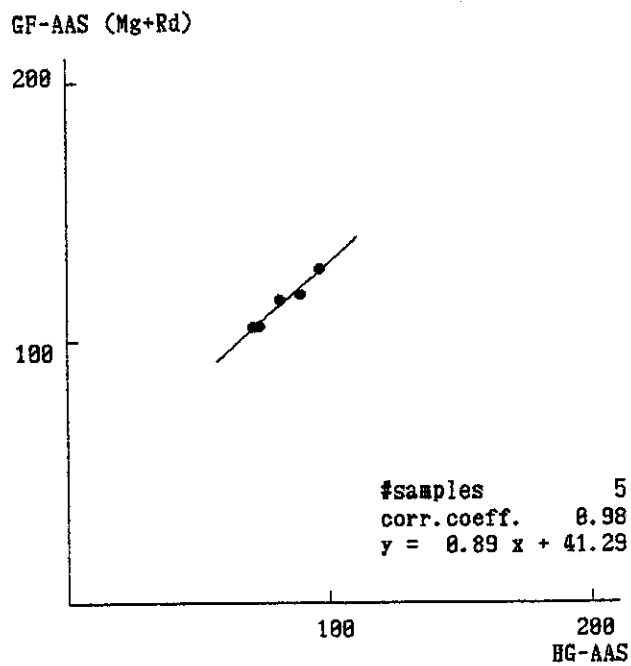


図3 Se濃度(ppb):
 グラファイト炉(GF)法と水素化物発生(HG)法

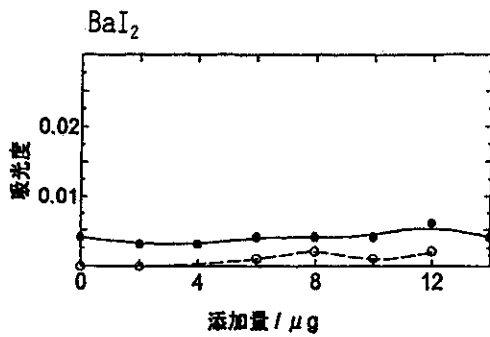
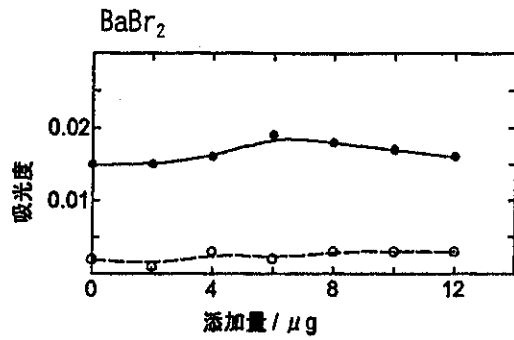
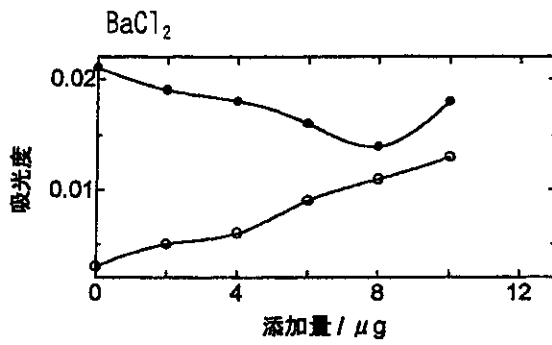
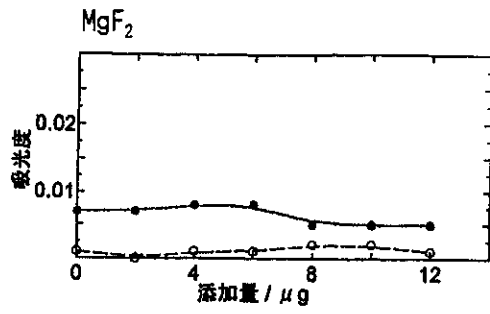
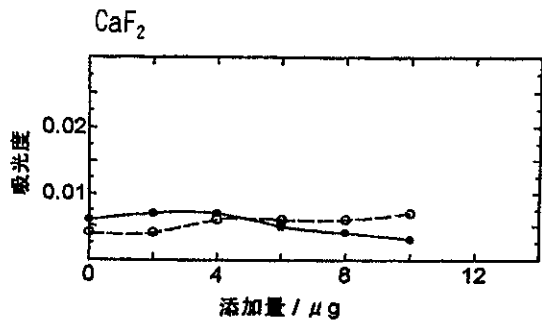


図 4 Mo 測定 : 修飾剤添加量 vs 吸光度
(○:Mo 吸収 ●:バックグラウンド)

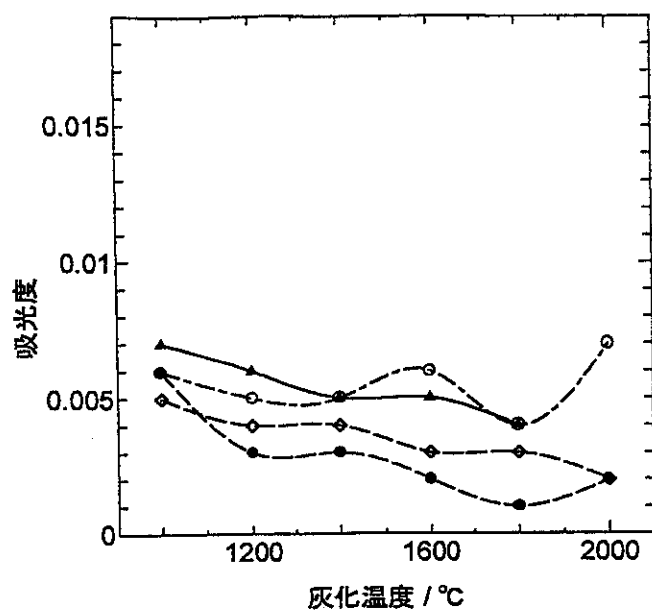


図5 Mo測定：灰化温度 vs 吸光度
 ▲:CaF₂ ○:MgF₂
 ◇:修飾剤無添加 ●:ハックグラウンド

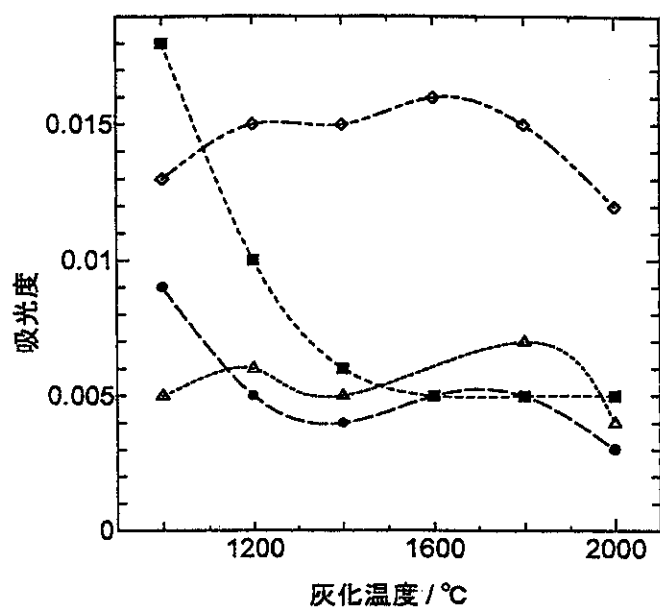


図6 Mo測定：灰化温度 vs 吸光度
 △:BaI₂ ◇:BaBr₂ ■:BaCl₂
 ●:ハックグラウンド

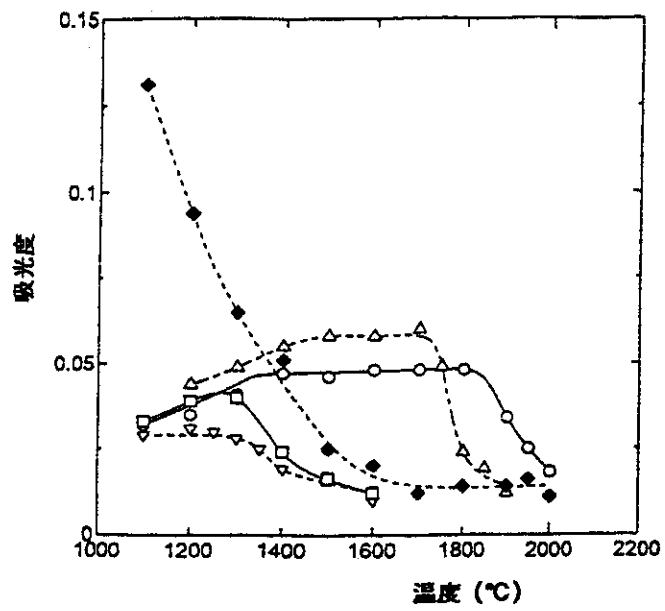
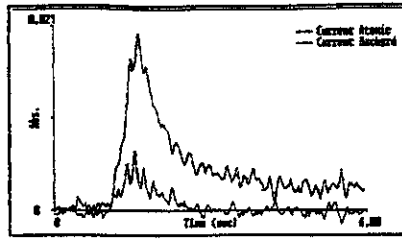
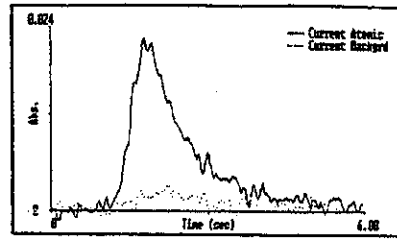


図7 Mo測定：灰化温度 vs 吸光度
 ▽:Mg(NO₃)₂ △:BaF₂ ○:PD+Mg(NO₃)₂
 □:修飾剤無添加 ◆:バックグラウンド

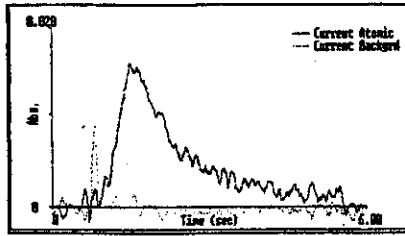
修飾劑無添加



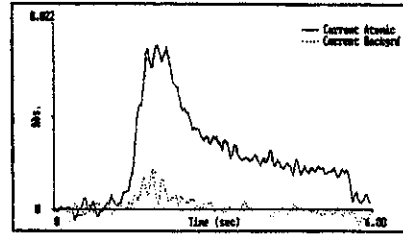
BaF₂



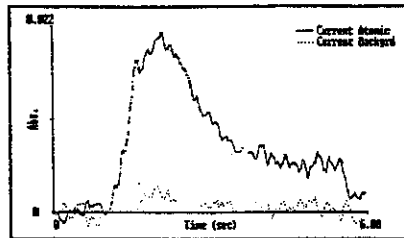
CaF₂



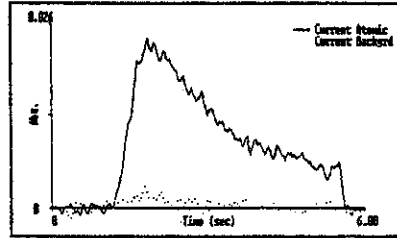
MgF₂



BaI₂



BaBr₂



BaCl₂

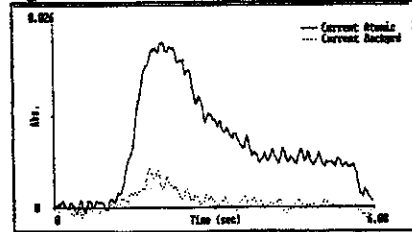


図8 Mo測定：吸光信号

新生児に対する E 大量投与の安全性に関する研究

清恵会病院 美濃 眞
大阪医科大学小児科 玉井 浩

要約

未熟児にビタミン E ニコチネート 1 日 40mg, 2 週間投与前後の血漿、赤血球、血小板、白血球中の alpha-tocopherol 値の変化、ならびにザイモザン刺激による化学発光値を測定した。

血漿、赤血球、血小板中 alpha-tocopherol 値は投与前値に比べて、投与 2 週間後は約 2.5 倍に増加した。白血球 alpha-tocopherol 値は投与後約 7 倍に増加した。しかし、白血球のザイモザン刺激による化学発光能には変化を与えなかった。

緒言

ビタミン E の大量摂取についての安全性は、一般的にはほぼその安全性が確立されているが、まだ安全性について確立されていないものは、新生児（特に未熟児）と、血液凝固抑制剤を服用している場合である。特に未熟児については、その酸素治療による酸素中毒による障害を防止するために、欧米特にアメリカで、1980 年代に抗酸化作用を期待してのビタミン E 製剤の静脈内投与治療が行われた経緯があった。そのビタミン E 剤は di-alpha-tocopheryl acetate を主剤とし、水溶化剤として 9% Tween80 と 1% Tween20 を含む「E-Ferol」であり、そのビタミン E 剤の血管内注入治療のために発生した、肺障害、肝腫大、鬱滞性黄疸、腹水、脾腫、高塞素血症、血小板減少を伴う死亡を「E-Ferol 症候群」と唱えられた (1)。Alade (2) は PHA みよる白血球の幼弱化反応の検討よりビタミン E 剤に E-Ferol 症候群の原因は界面活性剤であって、ビタミン E ではないと提唱したが、未熟児に対するビタミン E 製剤の使用抑制勧告によって、その後のビタミン E の臨床使用が実施されなくなり、E-Ferol 症候群が界面活性剤によるものか、ビタミン E そのものによ

るものかは確認されないままに現在に至っている。今回、ビタミン E の安全性の検討にあたり、未熟児に対する安全性に焦点をあて、未熟児の白血球機能中、活性酸素生成能とくにスーパーオキシド産生能に対するビタミン E 大量経口摂取の影響についてしたので報告する。

研究方法

(1) 対象

大阪医科大学周産期センター入院中の疾患のない出生時体重 2,000g 以上の未熟児 6 例であった。

(2) 投与方法

ビタミン E 剤にはビタミン E ニコチン酸エステル (エーザイ) を用いた。ビタミン E ニコチン酸エステルを選んだ理由は、この製剤が無味無臭であることと、微細粉末であってミルクに均等に懸濁できるからである。懸濁であるのでミルクの浸透圧にも影響を与えない。投与量は 1 日 40mg/kg (alpha-tocopherol 20mg/kg) で二週間連続投与した。

(3) 検体採取

投与前に採血し、血漿、赤血球、血小板、白血球中の alpha-tocopherol を測定、同時に白血球のザイモザン処理による化学発光を測定した。2週間投与し、最後の投与後24時間後に再び採血し、同様の処理と測定をおこなった。採血後の血漿、および細胞分離は Kaempf らの記載(3)によった。

(4) 測定

(a) alpha-tocopherol 値 測定法：Tamai ら(4)によった。

(b) 白血球のスーパーオキシド発生能の測定：分離白血球をオプソナイズしたザイモザンの取り込みにより発生する化学発光をルシフェリン発光として、アロカ製化学発光検出器で測定した。この方法による発光はスーパーオキシド発生によるものであり、杉岡らの原法(5)に準じた。

上記の臨床研究は GCP に準拠した大坂医科大学治験委員会ならびに倫理委員会の承認を得たものである。

研究結果

未熟児にビタミン E ニコチネート 1 日 40mg を2週間投与前後の血漿、赤血球、血小板、白血球中の alpha-tocopherol 値の変化、ならびに化学発光値の測定結果を図1に示した。投与後の血漿、赤血球、血小板中の alpha-tocopherol 値は投与前値に比べて、投与後は 2.5 倍に増加した。白血球中 alpha-tocopherol 値は投与後、投与前値の約 7 倍に増加した。白血球のザイモザン刺激による化学発光のビタミン E 投与前後の値の変化を図2に示した。図に示したように白血球中ビタミンE値が投与後は非常な増加をもたらしたにもかかわらず、その化学発光には変化を与えなかった。

考案

E-Ferol 症候群は多臓器不全の病態を

示す。また、E-Ferol の注射投与でなくても、未熟児にビタミン E の大量経口投与で、壊死性腸炎の発生をみた報告(1)や、敗血症の増加の報告によって、アメリカの The Committee on Fetus and Newborn は低出生体重児に大量のビタミン E の投与を抑制する勧告を行った(6)。未熟児に対するビタミン E の投与による上記の障害は、白血球機能の低下を想像させる。この推論に対して、Aladeら(2)は白血球機能を低下させたのはビタミン E そのものでなく、ビタミン E の製剤化に使用した界面活性剤の Tween 20 や Tween 80 の polysorbate によるものであると、ラット白血球の PHA による幼弱化反応の減弱によって示したが、その後、明確な知見は得られていない。また、Okano ら(7)はヒト白血球に *in vitro* でビタミン E を添加して、白血球中のビタミン E 濃度を高めたり、ラットに大量のビタミン E を注射投与して白血球ビタミン E 値を高めて、白血球中ビタミン E 濃度が 10 倍以上に上昇すると、ザイモザン刺激による白血球の化学発光が減少し、スーパーオキシドの産生が低下すると報告している。今回、未熟児に投与したビタミン E 量は無ベータリポ蛋白血症や胆汁鬱滞症に発現するヒトのビタミン E 欠乏症の治療に用いる大量投与量に相当する量である。しかし、この投与量でも、白血球中ビタミン E 濃度が 7 倍に増加したにもかかわらず、ザイモザン刺激による、未熟児の白血球のスーパーオキシド産生能には影響を与えず、白血球の殺菌能を障害しないことが明らかになった。したがって、新生児、特に未熟児に対しても、所要量の約 10 倍のビタミン E の摂取は感染に対しても安全であると考えられた。

文献

1. Karp WB, Robertson AF (1986):
Vitamin E in neonatology.
Adv Pediatr 33, 127-148
2. Alade SL, Brown RE, Paquet A (1986)
Polysorbate 80 and E-Ferol toxicity.
Pediatr 77, 593-597
3. Kaempf DE, Miki M, Ogihara T, Okamoto R, Konishi K, Mino M (1994)
Assessment of vitamin E Nutritional status in neonates, infants and children – on the basis of alpha-tocopherol levels in blood components and buccal mucosal cells.
Internat J Vit Nutr Res 64, 185-191
4. Tamai H, Manago M, Yokota K, Kitagawa M, Mino M (1988)
Determination of alpha-tocopherol in buccal mucosal cells using an electro-chemical detector
Internat J Vit Nutr Res 58, 203-207
5. Sugioka K, Nakano M, Kurashige S, Akuzawa Y, Goto T (1986)
A chemiluminescent probe with a cypridine luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazole[1,2-a]pyridin 3 one, specific and sensitive for superoxide production in phagocytizing macrophages.
FEBS letters 197, 27-30
6. Committee on Fetus and Newborn, 1984-1985 (1985) Vitamin E and the prevention of retinopathy of prematurity.
Pediatr 76, 315-316
7. Okano T, Tamai H, Mino M (1991)
Superoxide generation in leukocyte and Vitamin E.
Internat J Vit Nutr Res 61, 30-26

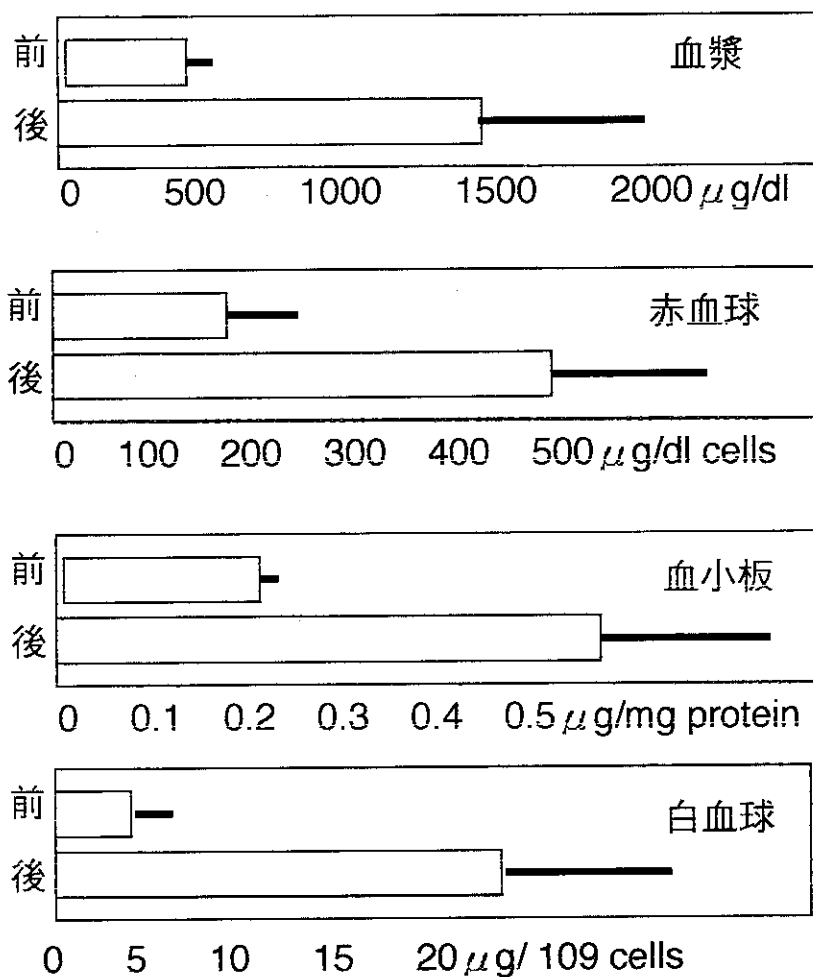


図1 未熟児にdl- α -tocopheryl nicotinate 40 mg/kg/day 2週間投与前後の血漿、赤血球、血小板、白血球中 α -tocopherol値の変化

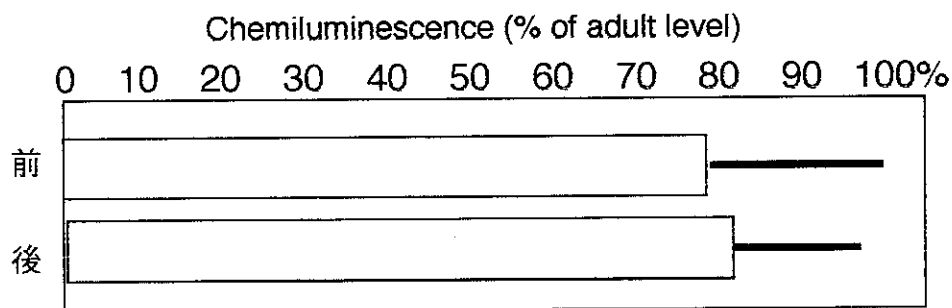


図2 未熟児にdl- α -tocopheryl nicotinate 40 mg/kg/day 2週間投与前後の白血球のZymozan刺激による化学発光値の変化

高齢入院患者におけるビタミン C、E 投与の相互作用 および尿中 8-OHdG 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

高齢者における酸化ストレスと抗酸化ビタミンの関連を明らかにするために、尿中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) とビタミン C (VC)、ビタミン E (VE) の血中濃度を VE、VC 投与の前後で検討した。対象は療養型病院へ入院中の 75 歳以上の高齢者 34 例(平均年齢 85.8 歳)。方法は尿中 8-OHdG の測定は ELISA 法、血清の VC (アスコルビン酸)、VE (α トコフェロール)測定は HPLC 法でおこなった。VE、VC 投与の影響を検討するために、1. VE 投与群 (11 例) : ニコチン酸トコフェロール 300 mg /日、2. VE+VC 投与群 (12 例) : ニコチン酸トコフェロール 300 mg /日、アスコルビン酸 600 mg/日、3. コントロール群 (11 例) : 不投薬、と 3 群に分け、各群の症例について、投与前、投与 1 ヶ月後で血液、尿データを検討した。血清 VC 濃度は、平均 0.18 mg/dl と低値であった。血清 VE 濃度は平均 0.69 mg/dl であった。血清 VC と VE 濃度は有意な相関関係が認められた。尿中 8-OHdG/Cr は 7 例 (20.6 %) で高値であったが、尿中 8-OHdG/Cr の値と、血清 VC 濃度との間には関連が認められなかった。血清 VE 濃度が 0.5 mg/dl 以下の低値の群では尿中 8-OHdG/Cr が、低値を示さない群 (平均 17.8 ng/mg) に比べて高値 (平均 26.4 ng/mg) であったが有意ではなかった。VE あるいは VE+VC 投与 1 ヶ月後には有意に血清 VE 濃度は上昇したが、VC 併用のほうが VE 単独よりも血清 VE 濃度は有意に増加した(VE 群 : 平均 1.43 mg/dl, VE+VC 群 : 平均 1.86 mg/dl)。VC 投与により血清 VC 濃度は平均 0.93 mg/dl (投与前平均 0.16 mg/dl) まで増加した。尿中 8-OHdG は VE あるいは VE+VC 投与にても有意な変化を認めなかった。以上より、高齢入院患者では高率に VC の欠乏状態が認められ、VE の補給時に VC 投与を併用することよりの VE 濃度が効率良く上昇することが明らかになった。また、尿中 8-OHdG は高値を示す症例が認められたが、VE、VC との関連は明らかではなかった。

A. 研究目的

高齢者においては酸化ストレスが亢進していることが報告されている¹⁾²⁾が、高齢入院患者の実態に関する報告は多くない。今回、我々は、酸化ストレスの指標として尿中の 8-hydroxydeoxyguanosine(8OHdG)³⁾⁴⁾⁵⁾を測定し、抗酸化ビタミンであるビタミンC (VC)、ビタミンE (VE)の血中濃度との関連を検討をした。また、VC、VEを投与し尿中 8-OHdG に影響を及ぼすかを検討した。

B. 研究方法

1) 対象

療養型病院へ入院中の 75 歳以上の高齢者 34 例 (男性 9 例、女性 25 例) を対象とした。年齢は 78 歳から 95 歳で平均年齢は 85.8 歳であった。入院病名は脳梗塞後遺症 10 例、脳動脈硬化症 8 例、脳血管性痴呆症 7 例、老人性痴呆症 7 例、狭心症 1 例、パーキンソン病 1 例であり、このうち糖尿病を合併しているのは 7 例であった。採血および測定の同意は口頭で得た。

また、尿中 8-OHdG のコントロールとして 30 歳以下の健常人 13 例で測定をおこなった。

2) 方法

- i) 血清アスコルビン酸、 α トコフェロール濃度および尿中 8-OHdG 測定

部分尿を採取し、遠心 (1,500 rpm X 10 分) 後上清を用いて尿中 8-OHdG の測定を ELISA 法にておこなった。また、同一サンプル中のクレアチニンを測定し、8-OHdG/クレアチニン (Cr) 比として表した。同時期に血清の VC (アスコルビン酸)、VE (α トコフェロール)濃度を HPLC 法にて測定した。

ii) VE、VC 投与の影響

対象患者を無作為に 3 群に分けた。すなわち、1. VE 投与群 (11 例) : ニコチン酸トコフェロール 300 mg /日を 1 ヶ月間投与、2. VE+VC 投与群 (12 例) : ニコチン酸トコフェロール 300 mg /日、アスコルビン酸 600mg/日を 1 ヶ月間投与、3. コントロール群 (11 例) : 不投薬、とした。各群の症例について、投与前、投与 1 ヶ月後で血液、尿データを検討した。

C. 研究結果

1) 血清アスコルビン酸および α トコフェロール濃度

血清アスコルビン酸濃度は 0.02~0.51 mg/dl に分布し、平均 0.18 mg/dl と低値であった。0.2 mg/dl 以下の顕性欠乏状態と考えられるのは 21 例 (61.7%)あり、残りのうち 8 例 (23.5%) も 0.4 mg/dl 以下の潜在性欠乏状態であった (図 1)。

血清 α トコフェロール濃度は 0.36

～1.25 mg/dl に分布し、平均 0.69 mg/dl であった。0.5 mg/dl 以下の低値を示した症例は 7 例 (20.6 %) であった (図 2)。

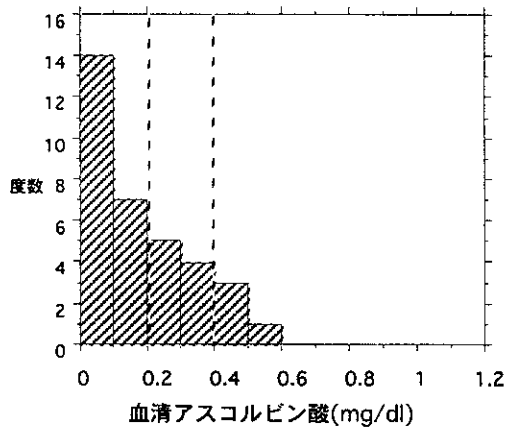


図 1. 血清アスコルビン酸濃度

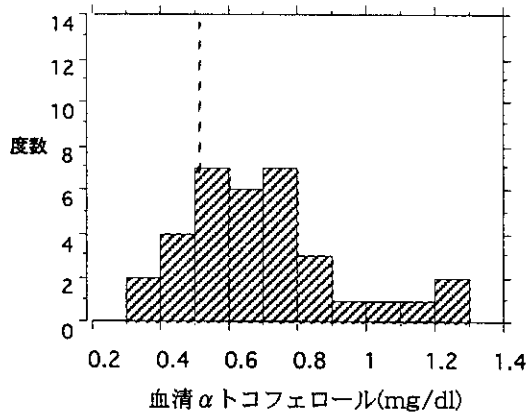


図 2. 血清 α トコフェロール濃度
血清アスコルビン酸と α トコフェロール濃度は有意な相関関係が認められた (図 3)。

2) 尿中 8-OHdG

高齢患者の尿中 8-OHdG/Cr は 1.5 ～92.4 ng/mg に分布し、平均 17.2 ng/mg であった。健常人の尿中 8-OHdG/Cr は 2.3～23.4 ng/mg に分布し、平均 15.1ng/mg であっ

た。他の報告からも 20 ng/mg 以下を健常人の基準値とすれば、高齢患者では 7 例 (20.6 %) で高値であった (図 4)。

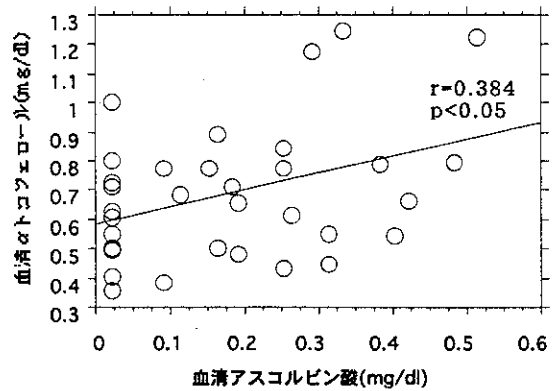


図 3. 血清アスコルビン酸、 α トコフェロール濃度の関連

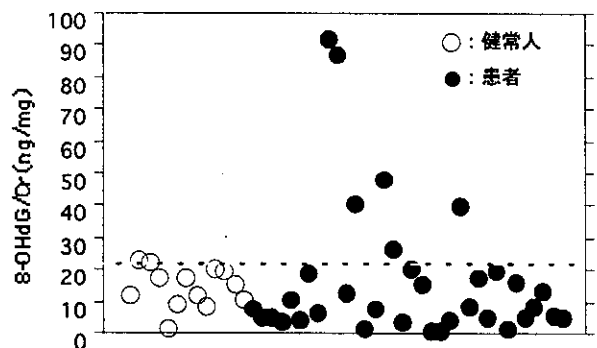


図 4. 尿中 8-OHdG

尿中 8-OHdG/Cr の値と、血清アスコルビン酸濃度との間には関連が認められなかった。血清 α トコフェロール濃度が 0.5 mg/dl 以下の低値の群では尿中 8-OHdG/Cr が、低値を示さない群 (平均 17.8 ng/mg) に比べて高値 (平均 26.4 ng/mg) であったが有意ではなかった。

3) VE, VC 投与の効果

VE あるいは VE+VC 投与 1 ヶ月後には有意に血清 α トコフェロール濃度は上昇した。また、VC 併用のほうが VE 単独よりも血清 α トコフェロール濃度は有意に増加した (VE 群: 平均 1.43 mg/dl, VE+VC 群: 平均 1.86 mg/dl) (図 5)。

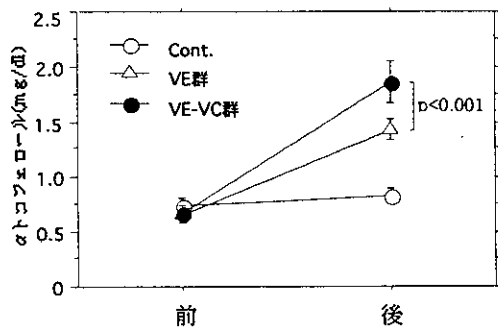


図 5. VE, VC 投与前後の血清 α トコフェロール濃度

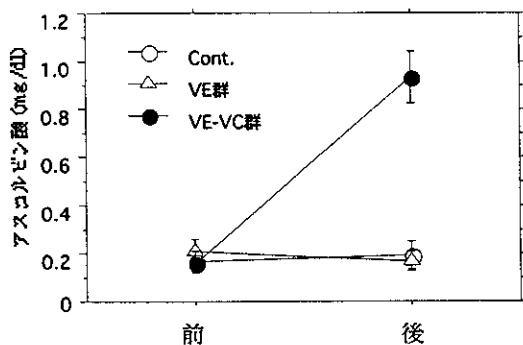


図 5. VE, VC 投与前後の血清アスコルビン酸濃度

VC 投与により血清アスコルビン酸濃度は平均 0.93 mg/dl (投与前平均 0.16 mg/dl) まで増加した。

尿中 8-OHdG は VE あるいは VE+VC 投与にても有意な変化を認めなかった。

D. 考察

高齢者の入院患者では、驚くべき程高率に VC の欠乏が認められた (潜在性、顕性をあわせると 85.3 %)。これは村田らの報告⁶⁾と同様であった。また、0.2 mg/dl 以下の顕性欠乏状態では壊血病の発症リスクが高いとされているが、特に出血傾向等の症状は認めなかった。なぜ、明らかな壊血病症状を生じないのかは不明である。また、食事中的 VC、VE 含量は厳密に検討できていないが、食事摂取量も低下しているわけではないので、VC 欠乏状態を起こす原因は不明である。なんらかの原因で VC 保持能が低下している可能性が考えられる。血清 α トコフェロール濃度が低値を示した患者は少ないが、組織内濃度を反映する可能性のある赤血球の α トコフェロール濃度等の検討も必要であろう。

また、VE と VC の併用は in vitro 実験^{7,8)} あるいは動物実験⁹⁾ で報告されているように VC が酸化型 VE を再生することにより VE が維持されると考えられているが、今回の結果はヒトの生体内でも実際に同様の反応がおこっていることを示すものである。今回は VC が欠乏していたために、VE 単独との差が大きくなったのかもしれない。

尿中 8-OHdG は酸化ストレスの指

標になるのではないかと考えられているが、今回は値が高い症例が存在するものの、血清アスコルビン酸、 α トコフェロール濃度とは関連を認めず、今後の検討課題と考える。

E. 結語

高齢入院患者では高率に VC の欠乏状態が認められた。また、VE の補給時に VC 投与を併用することによりの血清 VE 濃度が効率良く上昇することが明らかになった。尿中 8-OHdG が高い症例が認められたが、VE、VC との関連は明らかではなかった。

[文 献]

- 1) Yu BP: Oxidative damage by free radicals and lipid peroxidation in aging. *Free Radicals in Aging* (Yu BP, ed). CRC Press, Boca Raton, 1993, pp57-58
- 2) Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the generative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922, 1993
- 3) Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T: Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 76:365-374, 1997
- 4) Tsuboi H, Kouda K, Takeuchi H, Takigawa M, Masamoto Y, Takeuchi M, Ochi H: 8-hydroxydeoxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 138:1033-1035, 1998
- 5) Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T: Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* 33:689-695, 1998
- 6) 村田 晃, 姜 吉珍, 宮田 学, 藤井 浄, 美濃 真, 玉井 浩, 糸川嘉則, 木村美恵子: 高齢者における総合ビタミン剤長期服用効果: ビタミンC. *ビタミン* 69: 85-92, 1995
- 7) Packer JE, Slater TF, Willson R: Direct observation of free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278:737-739, 1979
- 8) Niki E, Tsuchiya J, Tamura R, Kamiya Y: Regeneration of vitamin E from α -chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chem Lett* 1982: 789-792
- 9) Igarashi O, Yonekawa Y, Fujiyama-Fujihara Y: Synergistic action of vitamin E and vitamin C in vivo using a new mutant of Wistar-strain rats, ODS, unable to synthesize vitamin C. *J Nutr Sci Vitaminol* 37:359-369, 1991

分担研究報告書

「日本におけるビタミンDの安全性限界の設定を目的とした研究」

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 日本におけるビタミンDの安全性限界を考慮した詳細な検討はほとんど行われていない。そこで、平成11年度はビタミンDの最大摂取許容量 (Tolerable Upper Intake : UL) の設定をテーマに研究を行った。20代の健常女性を対象に、D₃ 100 µg/日、200 µg/日 摂取群を設定し、高 Ca 血症を示さず血中 25-OH-D₃ 濃度が正常範囲上限値付近、1,25(OH)₂D₃ 濃度が正常範囲内であることを基準としてULの評価を行った。その結果、摂取開始後6週目において200 µg/日 摂取群の約1/2は正常範囲上限の80 ng/mlを越える血中 25-OH-D₃ 濃度を示すものの、この時点での血中Ca、1,25(OH)₂D₃濃度は全て正常値であることを確認した。このことから、20代の日本人健常女性のビタミンDの安全性限界は6週間の摂取期間において200 µg/日であると判断された。

研究協力者 津川 尚子 神戸薬科大学衛生化学研究室 講師
崎 善子 神戸薬科大学衛生化学研究室 研究生

A. 研究目的

ビタミンD (D) は体内で活性型となり、カルシウム (Ca) 代謝を調節する。Dの欠乏やD代謝異常が骨軟化症やくる病の原因となることや、Dの補給が骨粗鬆症の予防に有効であることが多数報告されている。

Dは皮膚の紫外線照射により体内で合成されることから、D欠乏は簡単にはおこりにくいと考えられている。しかし、室内で活動する人や寝たきりの高齢者などは、紫外線照射が少ないためDの意図的な摂取が必要となる。また、女性においては若年期からDとCaを積極的に摂取することが最大骨量の増加につながり、閉経後骨粗鬆症の予防に重要と考えられている。しかし、Dは長期間、多量に摂取すると、主にその活性代謝物である1,25(OH)₂Dの作用により高Ca血症とそれに伴う悪心、嘔吐、口渇、腎不全といった中毒症状が惹起される。した

がって、ビタミン補給剤や栄養補助食品の入手が簡便になった今日において、Dの副作用非発現量 (NOAEL) あるいは最低副作用発現量 (LOAEL)、最大摂取許容量 (Tolerable Upper Intake : UL) を決定し、過剰摂取を回避することは非常に重要な意味をもつと考えられる。

これまでの報告から、NOAEL、LOAEL、UL値を明確にするものは少なく、日本人における独自のデータは未だ得られていない。米国の National Academy of Sciences では、95 µg (3800 IU)/d の摂取で高 Ca 血症が惹起されたという報告¹⁾から、この投与量が LOAEL であると定義されている。しかし、M.J.Barger-Lux らの報告²⁾では、さらに高投与量である 250 µg (10,000 IU)/日、1250 µg (50,000 IU)/日を健常男性に2カ月間投与しても、高 Ca 血症はおこらないことが示されており、95µg (3800 IU)/日が LOAEL ではない

可能性が考えられる。D は体内に摂取されると、速やかに肝臓で 25 位が水酸化され血中に現れることから、血中 25-OH-D₃ 濃度は D 摂取の栄養学的指標とされている。上記の報告では 250 μg (10,000 IU)/日の投与において、血中 25-OH-D₃ 濃度は正常範囲を若干上回り、1250 μg (50,000 IU)/日ではかなりの高値となることも示されている。従って、250 μg (10,000 IU)/日の用量は、D の摂取量としては過剰である可能性が考えられる。

D の安全性限界を検討する介入試験において、LOAELを検討するためには明らかな過剰症（高Ca血症）を示す摂取群を設定しなければならず、安全性の面から事実上試験実施は困難といえる。ULは「特定のグループにおいてほとんどすべての人に健康上悪影響を及ぼす危険のない栄養素摂取量の最大限の量」とされ、今年度はULの設定を目的に研究を行うこととした。ULはNOAEL/UF（不確定要因：欧米では1.2とされる）で算出されるべき数値であるが、日本におけるUF値が不明であるため今回はD過剰症を発症しない摂取量を暫定的にULとした。

D 過剰症の発症機序として第一に挙げられるのは、D の活性代謝物である1,25(OH)₂D 濃度の上昇による高 Ca 血症の惹起である。25-OH-D を 1,25(OH)₂D に代謝する腎臓 1α-水酸化酵素は血中 Ca 濃度や副甲状腺ホルモン (PTH)、カルシトニンによって厳密に調節されているため、25-OH-D 濃度の増減に拘らず通常は正常範囲の 20-70 pg/ml に保たれる。しかし、血中 25-OH-D 濃度が極度に上昇した場合は、1,25(OH)₂D 濃度の上昇も観察される。一方、1,25(OH)₂D 濃度は正常であるにも拘らず 25-OH-D 濃度が高値を示すために過剰症が惹起される場合もある (Table 1)。Table 1 から判断すると、血中 25-OH-D 濃度が約 130-200 ng/ml 以上になると、高 Ca 血症を惹起し得る可能性が生じる。また、血中 25-OH-D 濃度が 300 ng/ml 以上に

なると 1,25(OH)₂D 濃度の上昇を伴う危険性も高くなる。長期にわたる D の大量摂取は、D あるいは 25-OH-D の体内蓄積を招き、これらは徐々に血中へ放出される。したがって、明らかな過剰症状を認めた後に摂取を中止した場合、過剰症の急速な改善は期待できず回復にはかなりの期間を要することになる。このことから、UL設定のための判定基準には、高 Ca 血症には至らないが D 摂取量としては過剰と判断される血中 25-OH-D 濃度を指標にすることが適当であると思われる。この条件を満たす 25-OH-D 濃度は、正常範囲上限である 80 ng/ml から過剰症発現の危険性がある 130 ng/ml までの濃度範囲である。

この範囲の血中 25-OH-D 濃度を示し得る D 摂取量としては、250 μg (10,000 IU)/日 が最も近いと考えられ、本試験ではこれを基本として投与量設定を行った。試験対象者は 20 代の健常女性であるため、健常男性を対象とした投与量 250 μg/日に男女の体重比 0.8 を乗じた数値、200 μg (8000 IU)/日 を最大投与量とし、また、その半量である 100 μg (4000 IU)/日 についても検討を行った。

B. 試験方法

【対象者】

20代健常女性。試験参加者は神戸薬科大学、大阪医科大学の女子学生を中心に募集し、自由意思により34名の参加同意が得られた。試験前の健康状態を把握するため、血液学的試験（赤血球数、白血球数、血小板数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球分類）及び血液生化学試験（GOT、GPT、LDH、ALP、γ-GTP、総蛋白、アルブミン、A/G比、T-CH、BUN、クレアチニン、CPK）を行うと共に、Ca、D代謝に異常がないことを確認した (Table 2)。

【摂取群及び摂取方法】

参加者は本人の自由意思により非摂