

取群 (n=9)、100 µg/日 摂取群 (n=12)、200 µg/日 摂取群 (n=13) の 3 群に分けられた。D 補給剤には 1 カプセルあたりコレカルシフェロール 5 µg 含む「ステイタスD<sub>3</sub>」(全薬工業株式会社製)を使用した。100 µg/日 投与群は 1 日 20カプセル、200 µg/日 投与群は 1 日 40カプセルを毎食後 3 回にわけて摂取した。

#### 【採血及び測定項目】

摂取開始前及び摂取開始より 2 週間ごとに採血を行い、D 代謝に関するパラメーターとして血中 25-OH-D<sub>3</sub>、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、Ca、PTH 及び Pi 濃度の測定を行った。また、血液学的検査及び血液生化学検査を、摂取開始前にあたっては全員、摂取開始後には D 摂取群に対して行った。試験期間は 8 週を期限とし、血中 25-OH-D<sub>3</sub> 濃度が正常値 (上限値 80 ng/ml) を上回る対象者が約半数現れた時点で試験を終了することとした。

試験実施期間は、紫外線による血中 D 代謝物濃度の変動を避けるため 10 月～12 月とした。

試験期間中、対象者は Ca や D 含量が極端に高いような食事を控え、通常の食事を摂るようにした。また本剤以外の薬剤、とくに Ca 剤、総合ビタミン剤の摂取は行わないことを指示した。

#### 【D 代謝パラメーターの測定】

対象者より EDTA2K 入の採血容器中に血液を採取し、3000 rpm、10 分の遠心分離により得られた血漿を試料とした。

#### 1) 血中 25-OH-D<sub>3</sub> 濃度及び血中 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 濃度

血漿 0.5 ml に回収率補正用の [<sup>3</sup>H]-25-OH-D<sub>3</sub> ([23,24(n)-<sup>3</sup>H]-25-OH-D<sub>3</sub>) : Amersham Co. (UK) 製)、 [<sup>3</sup>H]-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ([26,27-methyl-<sup>3</sup>H]-1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) : Amersham Co. (UK) 製) を各 2000 dpm 添加したのち、除タンパク及び脂質の抽出を行った。得られた脂質を Bond Elut C<sub>18</sub>OH column (Varian Associates, Inc. (USA)) に適用し 25-OH-D<sub>3</sub> 画分と 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 画分に分け、血

中 25-OH-D<sub>3</sub> 画分はさらに Bond Elut C<sub>18</sub> column (Varian Associates, Inc. (USA)) に適用した。得られた 25-OH-D<sub>3</sub> 画分は HPLC に、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 画分はレセプターアッセイ法に適用し定量した。測定値は回収率で補正し、血中濃度を算出した。

#### 2) 血中 Ca 濃度

Ca 濃度測定用キット : カルシウム C-テストワコー (和光純薬製) を用いた。

#### 3) 血中 Pi 濃度

モリブデン酸アンモニウム比色法で測定した。

#### 4) 血中 intact PTH 濃度

Allegro intact PTH キット (Nichols Institute Diagnostics) を用いて測定した。

#### 【承認】

本試験は大阪医科大学の倫理委員会の承認を得たのちに実施した。

#### C. 試験結果

試験期間を通して D 過剰症に関する自覚症状を訴えた者はいなかった。また、血液学的検査、生化学検査のいずれにおいても異常値は認められず (Table 3、4)、各被摂取者に対する安全性が確認された。

Fig. 1 に血中 25-OH-D<sub>3</sub> 濃度の経時変化を示す。摂取開始前では 3 群間に差はなく、D<sub>3</sub> の摂取開始後 2 週間で用量依存的な血中 25-OH-D<sub>3</sub> 濃度の上昇が認められた。2 週目から 4 週目にかけての上昇率は、摂取開始前から 2 週目にかけての上昇率に比べて低く、横這いの傾向を示した。しかし、4 週から 6 週目にかけては再び高い上昇率を示し、100 µg/日 群では平均値 66 ng/ml、200 µg/日 群では 83.0 ng/ml の血中濃度を示し、200 µg/日 群の約半数が正常範囲上限の 80 ng/ml を上回った。この結果から D<sub>3</sub> の摂取を終了し、以後経過観察を行った。非投与群の血中 25-OH-D<sub>3</sub> 濃度は試験開始後 4 週目で若干低下したが、これは秋から冬にかけての紫外線照射量の減少が影響し

たものと推察される。

血中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度は試験期間を通して正常範囲内にあり、摂取量に拘らず一定の値を示した (Fig. 2)。

血中 Ca、Pi、PTH 濃度を Table 5 に示す。D 過剰症の最も重要な指標となる血中 Ca 濃度は、試験期間を通して正常値を示し、摂取量あるいは血中  $25\text{-OH-D}_3$  濃度に拘らず 3 群間に差異は認められなかった。血中 Pi 濃度も同様に摂取前後において常に正常値を示した。血中 PTH 濃度は血中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度、あるいは血中 Ca 濃度と逆相関することが知られているが、これらの変動がみられなかったため、PTH 濃度も正常範囲でほぼ一定に保たれた。

#### D. 考 察

血中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度の上昇は、小腸からのCa吸収を増大させるとともに、骨塩動員作用により高Ca血症を惹起する。しかし、前述のように高Ca血症が血中  $25\text{-OH-D}_3$  濃度の上昇に起因する場合も多く、むしろ  $\text{D}_3$  の大量投与は  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  産生を低下させるとの報告もある<sup>3,4)</sup>。体内に吸収された  $\text{D}_3$  は、活性代謝物である  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  に代謝され、標的細胞核内に存在する D 受容体 (VDR) に結合し、標的遺伝子上流に存在する D 応答遺伝子に結合する。これがシグナルとなって D の作用が発揮される。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の前駆代謝物である  $25\text{-OH-D}_3$  の VDR 結合能は  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の約 1000 分の 1 であり<sup>5)</sup>、 $25\text{-OH-D}_3$  自身が VDR と結合して直接作用発現することは考え難い。脂溶性ビタミンである D は、特異的結合蛋白質である DBP と結合して血中を循環する。DBP との結合性が最も高い D 代謝物は、 $25\text{-OH-D}_3$  であり  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  はその約 10 分の 1 の結合性を示す<sup>6)</sup>。DBP との結合は血中安定性を高める一方、標的組織への取り込みを抑制する。 $25\text{-OH-D}_3$  の大部分は DBP と結合するが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は DBP との結合以外にアルブミンあるいは LDL な

どのリボ蛋白質と非特異的に結合し、この非特異的結合 (Free 体) の割合の増加が作用発現の増強につながる<sup>7)</sup>。現在のところ、 $25\text{-OH-D}_3$  濃度の増加による D 過剰症の発現機序は、過剰の  $25\text{-OH-D}_3$  が Free 体の  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  割合を増加させるとの考えが中心となっている。DBP の血中濃度 ( $6\sim 8\ \mu\text{M}$ )<sup>8)</sup> と D 代謝物の血中濃度 ( $0.1\sim 0.2\ \mu\text{M}$ ) を比較した場合、DBP 全体のわずか  $1\sim 3\%$  が D の運搬に働くため、 $25\text{-OH-D}_3$  の血中濃度の増加が Free 体の  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度増加に寄与するか否かについては疑問が持たれる。しかし、ラットの実験で、過剰症を示す最低量の  $\text{D}_3$  を投与した場合、 $\text{D}_3$ 、 $25\text{-OH-D}_3$  及び他の D 代謝物の血中濃度の合計量は  $5.3\ \mu\text{M}$  となり、DBP の濃度とほぼ同等になる<sup>9)</sup>ため、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の Free 体が増加する可能性は高い。これらの報告は、血中  $25\text{-OH-D}_3$  濃度の上昇が D 過剰症の発現に非常に重要であることを示している。

今回の摂取量では明らかな D 過剰症は認められなかったが、 $200\ \mu\text{g}/\text{日}$  群では 6 週間で血中  $25\text{-OH-D}_3$  濃度が正常値上限に達した。従って、この摂取期間においては  $200\ \mu\text{g}/\text{日}$  が UL に最も近い量であると推察される。この間、両摂取群共に血中  $25\text{-OH-D}_3$  濃度の上昇は 2 から 4 週目で一旦横這う傾向があるが、この原因については現在明らかではない。4 週目において非摂取群の血中  $25\text{-OH-D}_3$  濃度が季節変動により若干低下したことから考えると、その影響を受けた可能性が考えられる。一方、 $\text{D}_3$  は脂肪組織、 $25\text{-OH-D}_3$  は筋肉組織に蓄積されやすいため<sup>10)</sup>、これらの組織への移行時期と重なった可能性も考えられる。D の過剰症が慢性化した場合、その摂取を中断しても血中  $25\text{-OH-D}_3$  濃度が長期にわたって低下しない場合がしばしば見受けられる<sup>11)</sup>。それは、組織に蓄積された大量の  $\text{D}_3$  あるいは  $25\text{-OH-D}_3$  が徐々に血中へ放出されることが原因であるが、今回の場合、摂取終了後 1 週間目の血中  $25\text{-OH-D}_3$

濃度は摂取中とほとんど同等であるものの、4週間目では明らかな低下が見られている。したがって、この用量では慢性的な過剰症を惹起するほどのものではなかったと判断される。

#### E. 結 論

20代の日本人健康女性のビタミン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。

#### F. 文 献

- 1) J Accoc Physicians India, 1984, 32, 185-6, Narang NK et al
- 2) Osteoporosis Int, 1998, 8, 222-30, Barger-Lux MJ et al
- 3) Arch Biochem Biophys, 1980, 202, 43-53, Sheppard RM et al
- 4) Arch Biochem Biophys, 1995, 319, 535-9, Matthew J et al
- 5) Calcif Tissue Int, 1981, 33, 1-4, Stern PH et al
- 6) Biochem J, 1979, 179, 413-23, Kawakami et al
- 7) Ann Intern Med, 1995, 122, 511-13, Pettifor JM et al
- 8) J Clin Endocrinol Metab, 1977, 45, 225-31, Bouillon R et al
- 9) Endocrinology, 1977, 100, 642-7, Rojanasathit S et al
- 10) Clinical Science, 1972, 43, 413-31, Mawer EB et al
- 11) Endocrine J, 1994, 41, 329-37, Sato K et al

Table 1 ビタミンD摂取量と Ca , 25-OH-D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D 濃度

Subjects	Age	Dose (ug/day)	Duration	25-OH-D (ng/ml)	1,25(OH) <sub>2</sub> D (pg/ml)	Ca (mg/dl)	Reference
< Hypercalcemia >							
F, healthy	79	279	4 m	270	22-35.8	12.7	1
F, healthy	81	280	4 m	280	22.0	13.8	1
F, healthy	39	366	4 m	170	35.8	15.0	1
M, healthy	82	418		360	<u>139.8</u>	12.0	1
M, sick	71	1250	24 y	253	54.9	12.8	2
F, healthy	78	1250	20 y	361	<u>84.0</u>	13.8	2
F, osteoporosis	68	1250	6 m	136	—	15.0	3*
F, healthy	72	1456		310	<u>149.8</u>	11.7	1
M, sick	32	1875	10 y	227	<u>73.2</u>	16.2	2*
F, sick	44	2500	10 y	398	49.9	12.1	2
F, healthy	51	2500	10 y	342	<u>99.0</u>	13.4	2
F, healthy	75	2500	6 y	311	<u>107.3</u>	13.2	2
M, sick	15	5000	10 y	688	<u>119.4</u>	12.8	2
F, healthy	72	30000	5 m	363	69.9	12.3	2
< Normocalcemia >							
M, healthy (n=11)	28	250	2 m	85	39.1	normal	4
M, healthy (n=14)	28	1250	2 m	284	33.8	normal	4

M: male, F: female,

underline : > 70 pg/ml

\* : with Ca supplementation

- 1) N Eng J Med 1992, 326, 1173-7, Jacobus CH et al
- 2) Cli Sci 1985, 68, 135-141, E B Mawer et al
- 3) Am J Med, 1987, 82, 224-230, M S Schwartzman et al
- 4) Osteoporosis Int, 1998, 8, 222-230, M J Barger-Lux et al

Table 2 対象者の試験前検査結果

	control (n=9)	100 µg/d (n=12)	200 µg/d (n=13)
年齢 (years)	23.3±0.8	21.7±0.2	22.9±0.4
体重(kg)	48.1±1.5	50.5±1.7	50.0±0.7
身長(cm)	158.1±2.1	158.0±1.2	161.3±1.0
血中25-OH-D <sub>3</sub> 濃度(ng/ml)	27.2±3.0	25.8±3.7	29.0±3.0
血中1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> 濃度(pg/ml)	38.8±5.2	37.2±3.2	36.1±5.1
血中 Ca 濃度(mg/dl)	9.46±0.1	9.60±0.2	9.33±0.1
血中 Pi 濃度(mg/dl)	3.24±0.1	3.19±0.1	3.38±0.1
血中 PTH 濃度(pg/ml)	23.6±2.3	22.8±3.3	32.0±5.2

Table 3 血液学的検査

		0	2week	4week	6week	1 week after dosage ceased
白血球数 ( $\mu\text{l}$ ) [3500-10000]	非投与群	6225 $\pm$ 390	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	7364 $\pm$ 339	5658 $\pm$ 344	5827 $\pm$ 386	6400 $\pm$ 394	5275 $\pm$ 440
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	6285 $\pm$ 325	5985 $\pm$ 316	5762 $\pm$ 285	5800 $\pm$ 357	5715 $\pm$ 383
赤血球数 (万/ $\mu\text{l}$ ) [380-500]	非投与群	436 $\pm$ 6	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	433 $\pm$ 7	429 $\pm$ 5	437 $\pm$ 6	439 $\pm$ 5	433 $\pm$ 6
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	435 $\pm$ 8	433 $\pm$ 6	431 $\pm$ 7	435 $\pm$ 10	430 $\pm$ 7
ヘモグロビン ( $\text{g}/\text{dl}$ ) [11.5-15.5]	非投与群	13.3 $\pm$ 0.2	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	13.0 $\pm$ 0.2	13.0 $\pm$ 0.2	13.3 $\pm$ 0.3	13.3 $\pm$ 0.2	13.1 $\pm$ 0.2
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	13.3 $\pm$ 0.2	13.3 $\pm$ 0.2	13.3 $\pm$ 0.2	13.3 $\pm$ 0.3	13.3 $\pm$ 0.2
ヘマトクリット (%) [34-45]	非投与群	40.8 $\pm$ 0.6	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	40.0 $\pm$ 0.7	39.3 $\pm$ 0.6	40.0 $\pm$ 0.7	40.3 $\pm$ 0.6	39.7 $\pm$ 0.7
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	39.6 $\pm$ 0.8	40.1 $\pm$ 0.5	39.5 $\pm$ 0.8	39.5 $\pm$ 0.9	40.0 $\pm$ 0.6
血小板数 (万/ $\mu\text{l}$ ) [13-38]	非投与群	22.8 $\pm$ 1.1	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	25.8 $\pm$ 1.8	24.4 $\pm$ 1.3	25.1 $\pm$ 1.6	27.5 $\pm$ 1.9	26.0 $\pm$ 1.6
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	24.8 $\pm$ 1.0	24.0 $\pm$ 0.7	26.5 $\pm$ 0.9	26.1 $\pm$ 1.2	25.6 $\pm$ 1.3
白血球分類						
Ne (%) [40-77]	非投与群	61.1 $\pm$ 3	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	60 $\pm$ 3	56 $\pm$ 2	57 $\pm$ 2	56 $\pm$ 2	57 $\pm$ 3
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	57 $\pm$ 2	57 $\pm$ 2	56 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2	53 $\pm$ 3
Eos (%) [0-9]	非投与群	1.4 $\pm$ 0.3	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	1.5 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.6
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	1.7 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.9
Bos (%) [0-3]	非投与群	0.5 $\pm$ 0.2	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	0.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.1
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	0.3 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0 $\pm$ 0
Mon (%) [1-8]	非投与群	6.2 $\pm$ 0.4	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	5.3 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	6.4 $\pm$ 0.5	6.1 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 0.6
Ly (%) [21-53]	非投与群	33 $\pm$ 2	-	-	-	-
	100 $\mu\text{g}/\text{d}$	32 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	35 $\pm$ 2	36 $\pm$ 2
	200 $\mu\text{g}/\text{d}$	34 $\pm$ 2	36 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2	37 $\pm$ 2

- : 測定していないことを示す

[] : 正常範囲

Table 4 生化学学的検査

		0	2week	4week	6week	1week after dosage ceased
GOT (IU/L) [7-40]	非投与群	16±1	-	-	-	-
	100 µg/d	15±1	16±1	14±1	16±1	16±1
	200 µg/d	17±1	17±1	17±1	18±1	17±1
GPT (IU/L) [3-39]	非投与群	13±2	-	-	-	-
	100 µg/d	14±1	13±1	11±1	12±1	13±1
	200 µg/d	14±2	13±2	13±2	13±3	13±2
LDH (IU/L) [200-460]	非投与群	327±12	-	-	-	-
	100 µg/d	322±14	300±15	289±14	303±15	293±15
	200 µg/d	327±11	323±12	337±26	306±8	298±7
ALP (IU/L) [72-235]	非投与群	129±6	-	-	-	-
	100 µg/d	123±10	124±8	119±8	129±8	122±9
	200 µg/d	123±6	122±7	127±6	124±6	122±7
g-GTP (U/L) [0-40]	非投与群	10±2	-	-	-	-
	100 µg/d	11±1	10±1	12±2	11±1	12±3
	200 µg/d	9±1	10±1	9±1	10±1	9±1
総蛋白 (g/dl) [6.5-8.5]	非投与群	7.7±0.1	-	-	-	-
	100 µg/d	7.7±0.1	7.6±0.1	7.4±0.2	7.7±0.1	7.6±0.1
	200 µg/d	7.5±0.1	1.6±0.1	7.6±0.1	7.6±0.1	7.5±0.1
アルブミン (g/dl) [3.5-5.2]	非投与群	4.8±0.3	-	-	-	-
	100 µg/d	4.5±0.1	4.4±0.1	4.3±0.1	4.5±0.1	4.4±0.1
	200 µg/d	4.4±0.1	1.4±0.1	4.4±0.1	4.5±0.0	4.4±0.1
A/G比 [1.00-1.90]	非投与群	1.4±0.04	-	-	-	-
	100 µg/d	1.4±0.05	1.4±0.04	1.4±0.04	1.4±0.04	1.4±0.04
	200 µg/d	1.4±0.03	0.4±0.03	1.4±0.04	1.5±0.03	1.4±0.03
T-CH (mg/dl) [120-220]	非投与群	185±6	-	-	-	-
	100 µg/d	168±7	168±6	162±7	167±5	167±6
	200 µg/d	171±6+	170±7	168±7	172±2	182±9
BUN (mg/dl) [7-23]	非投与群	14±1	-	-	-	-
	100 µg/d	14±1	14±1	13±1	13±1	13±1
	200 µg/d	15±1	14±1	14±1	12±1	13±1
クレアチニン (mg/dl) [0.6-1.3]	非投与群	0.9±0.0	-	-	-	-
	100 µg/d	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0
	200 µg/d	0.9±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0
CPK (U/L) [30-210]	非投与群	93±7	-	-	-	-
	100 µg/d	69±3	-	-	-	-
	200 µg/d	101±9.7	79±11	73±9	68±7	72±6

- : 測定していないことを示す

[] : 正常範囲

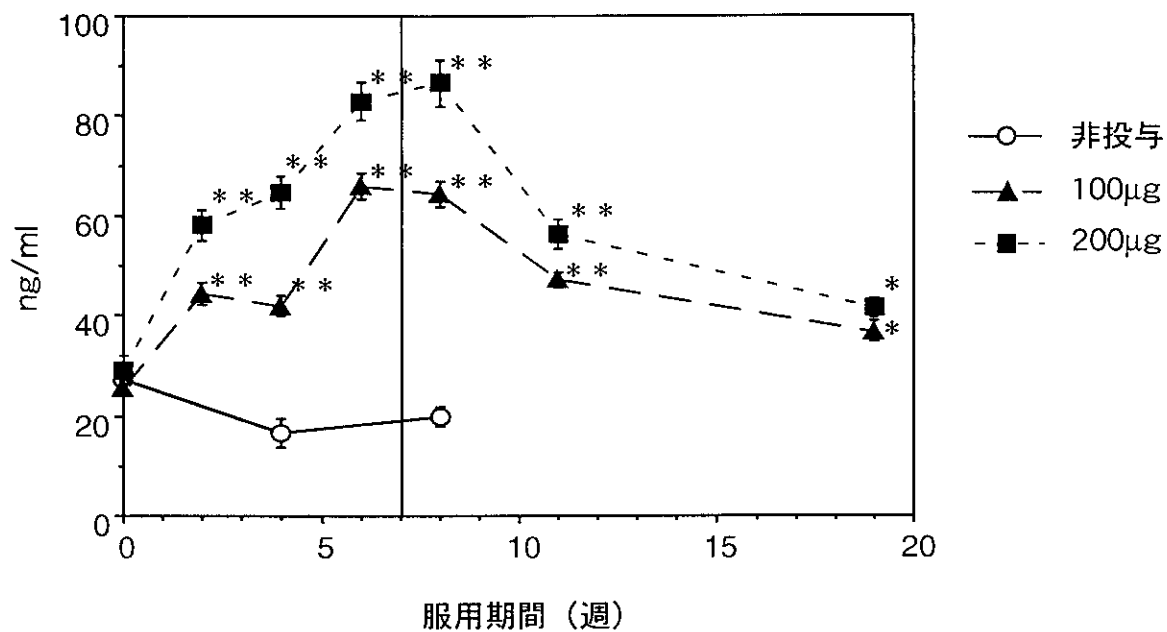
Table 5 各検査項目の結果

[normal]		0	2week	4week	6week	1week after dosage ceased
Ca (mg/dl) [8.5-10.9]	control (n=9)	9.46±0.1	—	9.00±0.1	—	9.28±0.1
	100 µg/d (n=12)	9.60±0.2	9.42±0.2	9.03±0.	9.03±0.31	9.68±0.1
	200 µg/d (n=13)	9.33±0.1	9.48±0.1	9.22±0.1	9.02±0.2	9.71±0.2
Pi (mg/dl) [2.5-4.8]	control (n=9)	3.24±0.1	—	3.67±0.1	—	3.72±0.6
	100 µg/d (n=12)	3.19±0.1	3.76±0.1	3.76±0.2	3.97±0.1	3.67±0.2
	200 µg/d (n=13)	3.38±0.1	3.91±0.1	3.91±0.2	3.82±0.1	4.01±0.1
PTH (pg/ml) [10-65]	control (n=9)	23.6±2.3	—	19.7±4.2	—	
	100 µg/d (n=12)	22.8±3.3	33.5±3.9	18.3±2.2	36.0±1.8	
	200 µg/d (n=13)	32.0±5.2	33.5±4.0	25.2±2.0	33.5±2.2	

— : 測定していないことを示す

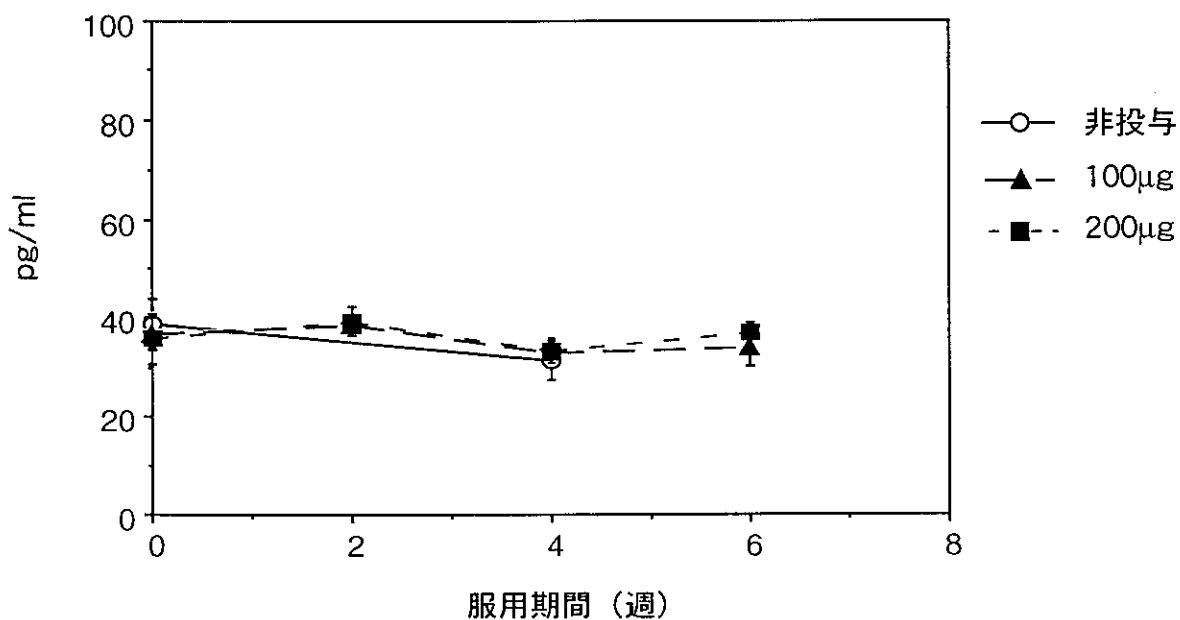
[] : 正常範囲

Fig.1 血中 25-OH-D3 濃度



Significance of difference from  $t_0$ : \*  $p < 0.01$   
 Significance of difference from  $t_0$ : \*\*  $p < 0.001$

Fig.2 血中 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 濃度





## 平成 11 年度研究報告書

分担研究課題 ビタミン C と水溶性ビタミンの安全性に関する研究

分担研究者 藤原葉子 (お茶の水女子大学生活科学部助教授)

研究要旨 食品添加物として多く用いられているビタミン C (アスコルビン酸, AA) の異性体であるエリソルビン酸(ERA)とその酸化型であるデヒドロエリソルビン酸(DERA)を、モルモットに大量に投与した場合の生体内における効果および生体内分布を調べ、アスコルビン酸と比較した。モルモットにビタミン C 欠乏飼料を 18 日間投与した後に 4 群に分け、アスコルビン酸(AA)、酸化型アスコルビン酸(DHA)、エリソルビン酸(ERA)、酸化型エリソルビン酸(DERA)をそれぞれ 100mg 経口投与し、さらに 12 日間飼育した。異性体である ERA や DERA は AA や DHA に比べると組織中には、約 20 分の 1 程度しか取り込まれていなかったが、酸化型である DHA や DERA のみを投与した群でも、血中および臓器中ではほとんどが還元型の AA および ERA として存在していた。飼育 28 日後の 4 群の外観、体重、臓器重量、アルカリフォスファターゼ活性に差はなく、投与したすべての群でほぼ同等のビタミン C 生理活性を示した。食品中で酸化された DERA を大量に摂取しても、生体内に取り込まれる量はアスコルビン酸より少なく、体内で還元されて再びアスコルビン酸としての効果をもつことから、今回の実験条件では安全性には問題は見られなかった。

### A 研究目的

第 6 次栄養所要量の改訂により、ビタミン C の所要量は一日 100mg と設定された。実際の一日の摂取量を 54 人の女子大生ボランティアの食事調査から行ったところ、摂取量の平均値は 108mg であったがその幅は広く、最低摂取値は 5mg、最高摂取値は 1002mg 値であった (大塚恵未発表データ)。この差の原因は食品そのものというより、食品中に抗酸化剤としてビタミン C が多用されていることによる。これまでビタミン C は大量に投与しても安全性にはそれほど問題はないと考えられているが、抗酸化剤として使用されているビタミン C には天然型のアスコルビン酸(AA)のほかに、その異性体であるエリソルビン酸(ERA)があり、ハム、ソーセージなどの肉製品を中

心に広く使用されている。ERA は AA のエピマーであるため、酸化還元に関わる化学的な性質は AA と同じであるが、生体内におけるビタミン C としての作用は AA より小さいことが知られている。今回は抗酸化剤として使用された ERA、特に酸化型エリソルビン酸を大量投与したときの影響について報告する。

### B 研究方法

#### 1) 酸化型 AA および ERA の調製

AA および DERA の酸化型は高純度のものが入手できないため、それぞれ AA、DERA を酸化して調製した。6.5g の AA および ERA を 250ml のメタノールに溶かし、12g の活性炭(Norit SX Plus)を加えて、4 時間酸素を通気した。ろ紙でろ過した後

エバポエートしてそれぞれ DHA、DERA のシロップを得た。シロップ中の AA、DERA の濃度は 75%でそれぞれの還元型は 0.01%以下しか検出できなかった。試料の安定性を考慮してモルモットに投与するためには、毎日調製することとした。

## 2) ビタミン C 欠乏モルモットに及ぼす酸化型エリソルビン酸の影響

36 匹のハートレイ系雄モルモットを市販固形飼料で 4 日間予備飼育後、ビタミン C 欠乏飼料（日本クレア製モルモット用特殊飼料）を与え、18 日間飼育した。飼育 18 日目にモルモットを A、DA、E、DE 群の 4 つに分け、それぞれ AA、DHA、ERA、DERA を 100mg ずつ毎日経口投与した。経口投与をはじめて 12 日後に、ネンブター麻酔したモルモットを回復して腹部大動脈より採血し、肝臓、腎臓、副腎、脾臓を採取した。血漿および臓器中のビタミン C 濃度は HPLC-ECD 法で測定した。酸化型ビタミン C は血漿に DTE を加えて還元した総ビタミン C 量から、還元型のビタミン C を差し引くことによって算出した。また、壊血病の指標として血漿中のアルカリフォスファターゼ活性を市販のキットを用いて測定した。

## C 研究結果

モルモットの成長曲線を Fig.1 に示した。ビタミン C 欠乏飼料で飼育すると 13 日以降から体重が減少し、18 日目には典型的な壊血病症状が認められた。ビタミン C の経口投与を開始すると、次第に体重も増加し、投与開始 12 日目にはすべての群で、外観的な壊血病症状の回復が認められ、体重についても 4 群間の差は見られなかった。

壊血病の指標としてアルカリフォスファターゼ活性を測定したところ(Table 1)、すべての群で有意差はみられず、正常値まで回復したことがわかった。すなわち、ERA や DERA は生体にはほとんど取り込まれないと考えられてはいるが、欠乏時に大量に摂取した場合には、AA や DHA と同等にビタミン C としての生理作用をもつといえる。

血漿および各臓器のビタミン C 濃度を Table 2 に示した。実際に組織中に取り込まれた値は AA や DHA に比較して、ERA や DERA では約 20 分の 1 で非常に低かった。さらに、酸化型である DHA や DERA のみを経口投与した DA 群、DE 群でも組織中ではそれぞれ AA や ERA の形で存在していることから、酸化型のビタミン C を投与しても、生体内で還元され、ビタミン C としての作用を持つことがわかる。

Fig.2 に各組織中での還元型に対する酸化型ビタミン C の割合を示した。脾臓を除いてどの群でも差は見られず、臓器間の差も見られなかった。生体内に取り込まれたビタミン C の約 80%は還元型で存在しており、酸化型で投与しても生体内で還元され、その存在比は還元型を投与したものと同変わらないことがわかった。

## D 考察

ERA は AA の異性体で類似な化学的性質をもつため、その抗酸化作用により、食品添加物として広く利用されている。一般に ERA の体内での利用効率は AA より非常に低く、生体内にも取り込まれにくいことが知られている。また、DHA は体内で還元され AA として利用されることが知ら

れているが、DERA の生体内での還元機構についての報告はない。今回、実際に動物に投与した実験で、DERA が体内で ERA に還元されることがはじめて示された。また、取り込みは少ないながらも ERA も DERA も壊血病症状を回復させる生理作用を発揮したこともわかった。血中および組織中でのビタミン C 濃度は ERA や DERA では AA や DHA に比較して 20 分の 1 程度であったことから、壊血病という症状を回復させるビタミン C の量を満たすには、少量ではあるが取り込まれた ERA、DERA の量で十分であったと考えられる。今回の実験は壊血病を指標としたが、ビタミン C のもつほかのさまざまな生理作用、たとえば免疫増強作用や、コラーゲン合成促進作用など、についての ERA、DERA の作用に関する研究は今後の課題であろう。

抗酸化剤として添加された ERA は、食品が酸化されやすい状態にあるときには DERA に酸化され、人体に摂取されていると考えられる。DHA の AA への生体内での還元機構については、腸内細菌による還元や、赤血球でのグルタチオンによる非酵素的な還元のほかに、最近 thioredoxin reductase による酵素的な還元機構も示唆されている。DERA の ERA への還元率は脾臓では AA に比べて少なくなっていることから、脾臓における組織特異性が考えられる。また、脾臓は赤血球が多い組織であるため、DHA でみられる酵素的な還元作用が DERA では作用しなかった可能性もあるかもしれない。しかし、ERA 投与群と DERA 投与群で還元型として存在する割合が同じであることから、食品添加物として我々の体内に取り込まれる DERA も

安全性の面からいえば、ERA のみを摂取するのと同様に考えればよいということがわかる。実際に我々が口にする食品中の DERA 量は ERA 中のわずかであり、今回大量に DERA を投与しても ERA に体内で還元されることから、現在添加物として使用されている ERA は生体内での取り込み、還元という観点からは安全であるといえよう。しかし、今回の実験は動物を対象としたものであり、さらに人間についても同様に取り込み、還元されるという研究が必要である。

これまで ERA は AA より安価であるために抗酸化剤として多く使用されてきたが、近年は AA と価格的に変わらなくなってきたために、ERA よりも AA の使用のほうが好まれる傾向にある。現在使われている ERA がすべて AA に変えられたときには、多種の食品を摂取することによって現状よりはるかに多くのビタミン C が体内に取り込まれる可能性は考えられる。

## E 結論

食品添加物として多く用いられている ERA と、その酸化型である DERA をモルモットに大量に投与した場合の生体内分布および生理効果を調べた。食品中で酸化された DERA を大量に摂取しても、生体内に取り込まれる量は AA より少なく、体内で還元されて再びビタミン C としての効果をもつことが明らかとなった。また、生体内に取り込まれた DERA は DHA とほぼ同様の還元機構によって還元型に再生されビタミン C としての作用を発揮するものと考えられるが、詳細はまだ明らかではない。少なくとも今回の実験条件では安全性につ

いての問題は認められず、食品添加物としての ERA の使用量から考えると、現状での ERA 摂取による安全性にも特に問題はないと考えられた。しかし、現在使われている ERA がすべて AA に変えられたときには、多種の食品を摂取することによって現状よりはるかに多くのビタミン C が体内に取り込まれる可能性は考えられる。

## F 研究発表

### 学会発表

- 1) モルモットにおける酸化型エリソルビン酸の抗壊血病効果

日本ビタミン学会第 51 回大会（静岡）

崔艶、藤原葉子、大塚恵

- 2) モルモットにおける酸化型エリソルビン酸の生理効果

第 10 回エリソルビン酸研究会（東京）

藤原葉子、崔艶、大塚恵

Fig.1 Growth Curve of guinea pigs

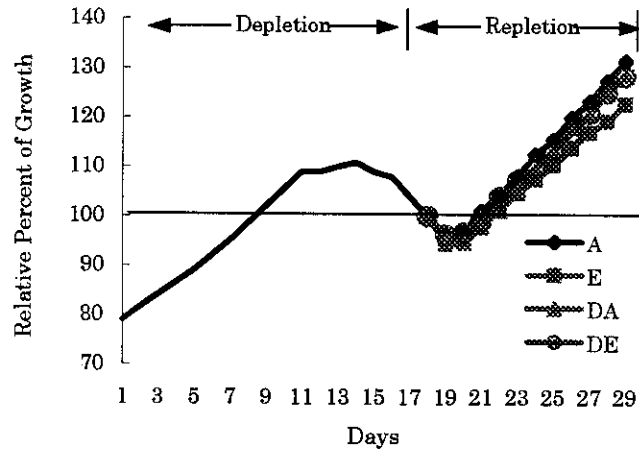


Table 1 Alkarine phosphatase activity in Serum

Group	Activity ( IU/l )
A	125 ± 0.67
DA	113 ± 0.54
E	118 ± 0.72
DE	125 ± 0.56

Values are means ± S E ( n = 9 )

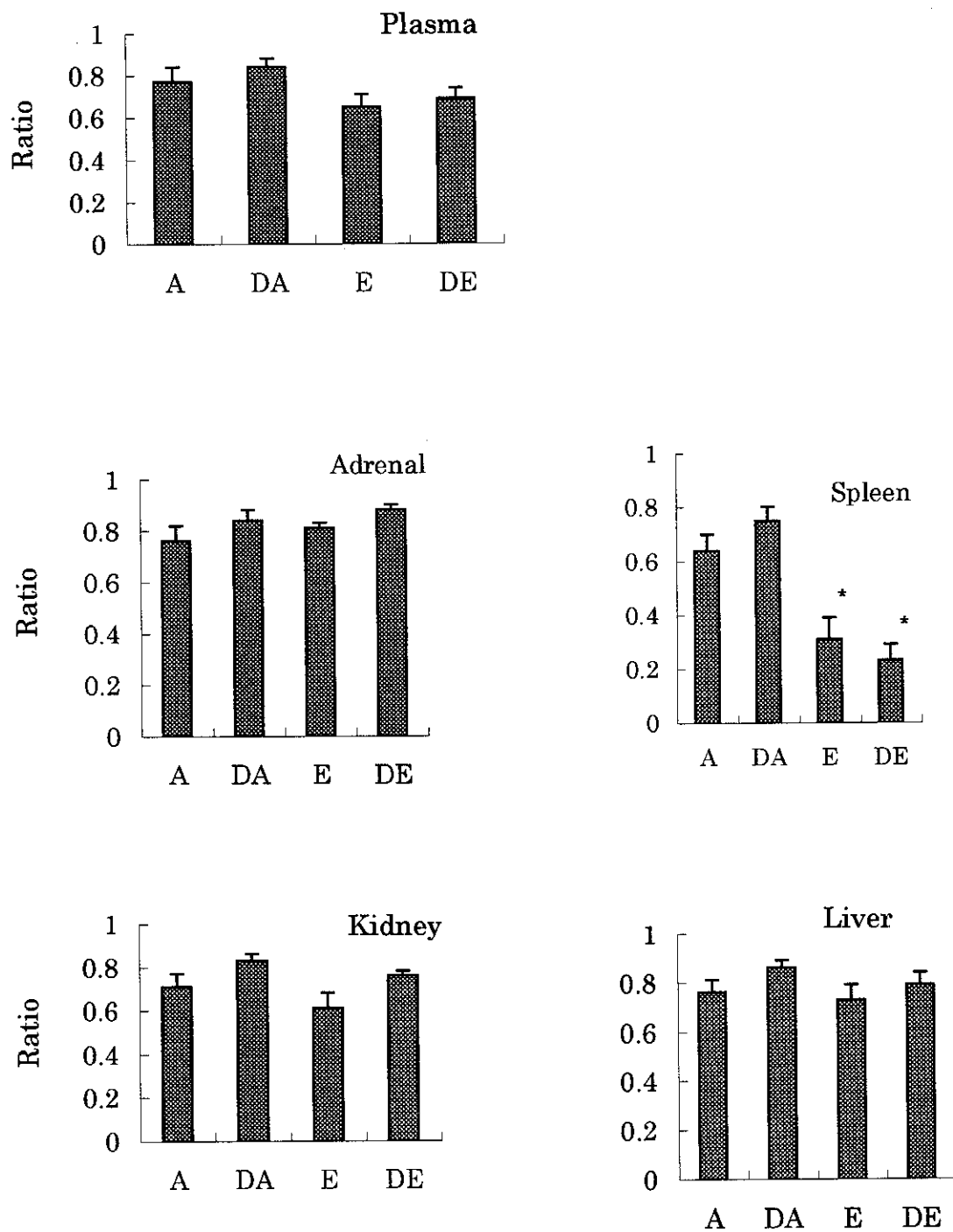


Fig.2 Ration of ASA, ERA, Compared to total ASA and Total ERA in tissues and plasma

Values are means  $\pm$  S E ( n = 9 )

Significantly different from A group ( \* , p < 0.05 )

# ビタミンE大量投与における安全性に関する検討

大阪医科大学小児科 玉井浩

## 研究要旨

今回日本の健康成人男性を対象にd- $\alpha$ -トコフェロール 1200IU/日を4週間投与し、その安全性について検討した。その結果ビタミンEの大量投与は血小板凝集能、止血機能には影響しなかった。また臨床症状および血液生化学検査上にも副作用は認められず、投与は安全であることが示唆された。

## はじめに

ビタミンEは最近の大規模疫学調査、介入試験において虚血性心疾患に対して、その発症頻度を有意に低下させる結果が次々と報告されている。

(1, 2, 3) 実際、ビタミンEは大衆薬局でも容易に入手できるビタミンであるため、多くの人たちが服用しているが、大量に購入され使用される恐れがある。したがって、ビタミンEの大量投与時の安全性に関する研究は重要な意味を持つ。ビタミンEはワーファリン投与患者における凝固異常の報告や(4)血小板凝集能抑制作用などを有すること(5)が知られておりその使用には注意が必要である。今回ビタミンE1200IU (800mg)/dayの大量投与時における止血機能および血小板凝集能について検討したので報告する。

## 対象と方法

ビタミンEの経口投与を行った健康成人男性14名(VE群)と、VEを投与していない健康成人男性8名(対照群)を対象とした。平均年齢(歳)はVE群で $29.3 \pm 3.4$ 、対照群で $27.0 \pm 1.2$ であった。ビタミンEの投与はd- $\alpha$ -トコフェロール800mg(朝200、昼300、夕300)を28日間連日経口投与した。早朝空腹時に採血を行い、凝固機能、血小板凝集能、血漿および血小板中のビタミンEを測定した。ビタミンEの測定には電気化学検出器を用いたHPLCにて行った(6)。

## 結果

1. ビタミンE投与開始前の血漿中 $\alpha$ -トコフェロ

ール値はVE群と対照群の間に差を認めなかった。投与開始後はVE群の $\alpha$ -トコフェロールは有意な増加を認め、14日目にはプラトーに達していた。

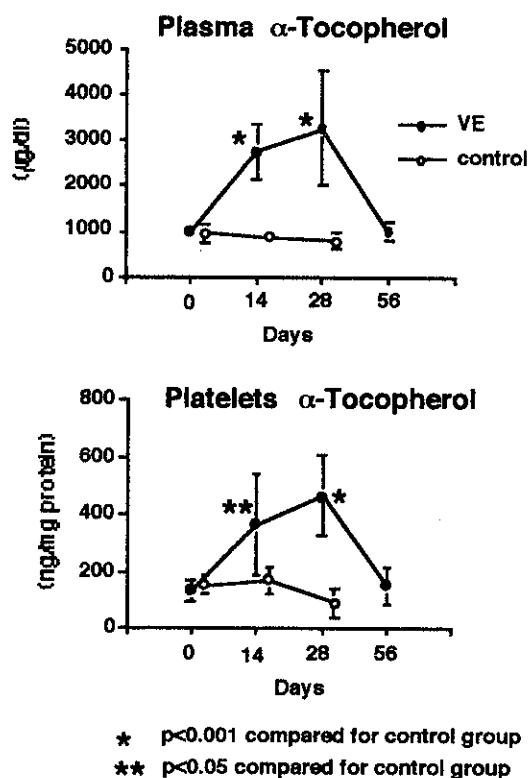


Fig. ビタミンE服用中における血漿および血小板中の $\alpha$ -tocopherolの変化

28日目の投与終了時には血漿中 $\alpha$ -トコフェロールは減少し、56日目には投与開始前と同レベルとなった。14日目および28日目の血漿中 $\alpha$ -トコフェロール値はVE群および対照群において有意差

を認めた。対照群の $\alpha$ -トコフェロールは経過中有意な変化を認めなかった。(Fig)

2. 血小板中の $\alpha$ -トコフェロールの変動は血漿中の $\alpha$ -トコフェロールと同様に投与開始後には有意に増加し、投与終了後 4 週間では投与開始前の値に回復した。(Fig)

3. 止血機能に関してはPT、APTT、HPTともに経過中有意な変化を認めなかった。(Table)

Table ビタミンE大量投与における止血機能および血小板凝集能

	Day 0	Day 28
PT(%)		
VE	108±9	111±6
Control	109±7	106±9
APTT(sec)		
VE	35.8±3.0	33.6±2.9
Control	36.5±3.2	35.2±2.7
HPT(%)		
VE	103±11	107±9
Control	103±11	108±12
PLT Aggregation		
ADP(%)		
VE	65.0±18.1	45.1±16.5
Control	58.5±18.0	41.4±22.4
Collagen(%)		
VE	84.1±8.1	84.5±7.3
Control	84.1±6.4	81.4±5.7

Mean±SD

4. 血小板凝集能はADP、コラーゲンともに有意な変化を認めなかった。(Table)

5. ビタミンE服用中に消化器症状、発熱、発疹などの副作用や検血一般、生化学検査における異

常値は認めなかった。(data not shown)

#### 考察

ビタミンEはその抗酸化作用を期待されて未熟児網膜症の発症予防のために以前より未熟児に大量投与されていた。効果については賛否両論であったが、比較的有効であったとするものが多かった。しかしその大量投与例において敗血症および壊死性腸炎の発症率が増加したとの報告がなされ(7)、米国のCommittee on fetus and newbornは未熟児に対するビタミンEの安易な投与を戒める見解を発表した(8)。これらは新生児あるいは未熟児にのみ認められた副作用ではあるが、このようにビタミンEも大量投与時には必ずしも安全とは言い難いことを念頭に置く必要がある。

$\alpha$ -Tocopherolを1200IU/day経口投与した今回の検討において、14日目および28日目は血漿 $\alpha$ -Tocopherolの有意な増加を認め、56日目には前値まで回復した。血小板中の $\alpha$ -Tocopherolは血漿中と同様に投与期間中は有意な増加を認め投与終了後1ヵ月時には前値まで回復していた。脂溶性ビタミンの大量投与時には組織蓄積性が懸念されているが、血小板に関しては蓄積は見られなかった。

ビタミンEは凝集能が亢進している血小板に対してはその凝集能を抑制することが知られており、その作用機序についてはビタミンEの抗酸化作用によって血小板中cyclooxygenaseが抑制され、それに引き続きthromboxaneA<sub>2</sub>の産生が低下するためと考えられている(5)。またビタミンE欠乏の患児に見られた血小板機能亢進状態がビタミンEの投与により改善されたとの報告もされている(9)。今回のビタミンE1200IU/日の投与においては血小板凝集能に変化は認められず、正常の血小板凝集能に対するビタミンEの大量投与は安全であることが示唆された。

ビタミンEの大量投与はビタミンK依存性凝固



因子活性を低下させることが知られており、ビタミンEを大量投与したひよこにおいてプロトロンビン時間の延長が認められそれはビタミンKの投与にて予防できたとの報告がある(10)。しかし健康成人における600mg/日の投与はPT, APTTを変化させなかったとの報告もある。(11) 今回の大量投与では凝固機能に対する影響は認められず、1200IU/日の投与では凝固機能には影響しないと思われた。

最近のdouble-blind randomized control trialでは、4-6年間のビタミンE400IU/日の連日摂取は虚血性心疾患に対して予防的効果がないと報告された(12)。しかしビタミンE400IUあるいは800IUの投与が虚血性心疾患の予防に有効であったとの報告もあり、ビタミンEが効果を発揮するには400IUより多くの投与量が必要なのかも知れない。このようなことより、ビタミンE1200IU/日の大量投与における安全性の検討は意義深いものと考えられる。

最後に、健康成人男性におけるビタミンE1200IU/日の4週間投与は、凝固機能および血小板凝集能に対する影響を認めず、またその他の副作用もなく投与は安全であった。今回の研究では高齢者および女性は含まれておらず、今後の検討が必要であると思われる。

#### References

1. Sies H. and Stahl W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62 suppl, 1315S-1321S.
2. Knekt P., Aromaa A., Maatela J., Aaran R.K., Nikkari T., Hakama M., Hakulinen T., Peto R. and Teppo L. Vitamin E and cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 53, 283S-286S.
3. Stephens N.G., Parsons A., Schofield P.M., Kelly F., Cheeseman K., Mitchinson M.J. and Brown M.J. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347, 781-785.
4. Corrigan J.J. Jr. and Ulfers L.L. Effect of vitamin E on prothrombin levels in warfarin-induced vitamin K deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981; 34, 1701-1705.
5. Ali M., Gudbranson C.G. and McDonald J.W.D. Inhibition of human platelet cyclooxygenase by alpha-tocopherol. *Prostaglandins Med.* 1980; 4, 79-85.
6. Tamai H., Manago M., Yokota K., Kitagawa M. and Mino M. Determination of alpha-tocopherol in buccal mucosal cells using an electrochemical detector. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1988; 58, 202-207.
7. Johnson L, Bowen Jr FW, Abbasi S, Herrmann N, Weston M, Sacks L, Porat R, Stahl G, Peckham G, Delivoria-Papadopoulos M, Quinn G, and Schaffer D. Relationship of prolonged pharmacologic serum levels of vitamin E to incidence of sepsis and necrotizing enterocolitis in infants with birth weight 1,500 grams or less. *Pediatrics.* 1985; 75, 619-638.
8. Committee on Fetus and Newborn. Vitamin E and the prevention of retinopathy of prematurity. *Pediatrics.* 1985; 76, 315.
9. Lake AM, Stuart MI, and Oski FA. Vitamin E deficiency and enhanced platelet function: reversal following vitamin E supplementation. *J. Pediatr.* 1977; 90,

722-728.

10. Jürgen Frank, Harald Weiser and Hans K. Biesalski. Interaction of Vitamins E and K: Effect of High Dietary Vitamin E on Phylloquinone Activity in Chicks. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 1997; 67, 242-247.

11. Kitagawa M. and Mino M. Effects of elevated d-alpha-RRR-tocopherol dosage in man. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1989; 35, 133-142.

12. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342, 154-160.

## ミネラルの安全性評価

—マグネシウム欠乏が引き起こす臓器中の鉄・銅含量と過酸化脂質量の変化—

分担研究者	鈴木 和春	東京農業大学教授
協力者	上原万里子	東京農業大学助教授
	増山 律子	東京農業大学講師

ラットに Mg の欠乏食を投与した時の組織中ミネラル分布と過酸化リン脂質量の変化について検討を行った。その結果 Mg 欠乏食投与により肝臓・心臓中鉄含量は上昇し、血漿、赤血球膜中の銅含量も上昇した。この様な遷移元素である Fe や Cu の蓄積が見られ、血漿、赤血球膜、肝臓、心臓および大動脈中 PCOOH 量は増加した。また、Mg 欠乏食投与により抗酸化酵素である SOD もしくは GPX の活性が肝臓、腎臓、心臓および血漿で低下し、Mg 欠乏食投与により血漿中脂質濃度の増加が観察されており、リポタンパクが酸化傷害されている可能性が示唆された。さらに生体内 DNA の酸化的損傷マーカーである 8-OHdG の尿中排泄量の増加が確認された。以上のことからこれらの組織中過酸化リン脂質の増加は遷移元素である Fe や Cu の蓄積が見られ、この現象が過酸化反応を引き起こす原因であることが推察された。

### 目的

マグネシウム(Mg)と循環器系疾患とは密接な関係にあり、その摂取不足は虚血性心疾患などを誘発するが Mg を補給することで抑制され、血栓形成を防ぐことが知られている<sup>1)</sup>。さらに、Mg の欠乏状態が持続すると組織中ミネラルの増減<sup>2)4)</sup>や脂質代謝異常<sup>5)6)</sup>が生じることも報告されている。特に木村ら<sup>7)9)</sup>は Mg 欠乏ラットの肝臓、脾臓における鉄沈着を報告しているが、この現象は鉄摂取量の増加により増強されるとしている。ところで、過酸化脂質量の増大には組織中の金属イオンが強く関与している。また、組織中の金属イオン特に、鉄や銅イオンの増加により過酸化脂質量が増加することが多く研究報告されている。

そこで、Mg 欠乏状態の生体内における過酸化リン脂質(phosphatidylcholine hydroperoxide(PCOOH) phosphatidylethanolamine hydroperoxide(PEOOH))がどのような

変動みせるのかを観察し、組織における抗酸化酵素として Superoxide dismutase(SOD), Glutathione peroxidase(GPX)の活性を測定した。また、鉄(Fe), 銅(Cu), カルシウム(Ca), マグネシウム(Mg)濃度を測定し、各組織の過酸化脂質量との関係について検討を行った。さらに、生体内 DNA の酸化的損傷マーカーとして尿中 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)の排泄量も検討した。

### 実験方法

#### 1. 実験動物及び飼育条件

被験動物として、3 週齢(初体重 35g 前後)の Wistar 系雄ラット(日本クレア(株))12 匹を用い、基礎飼料で 1 週間予備飼育後、各群の平均体重が等しくなるように無作為に正常食(以後、N)群と Mg 欠乏(以後、D)群の 2 群(各群 6 匹)に分け、4 週間飼育観察を行った。飼育条件は、動物飼育室の温度を  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度を 60~

65%程度に調整し,明暗 12 時間交代(8:00am~8:00pm)の照明制御を行った。飼料投与量はD群に合わせた pair-feeding とし,飲料水は蒸留水を用い自由摂取させた。

## 2. 実験飼料

実験飼料は AIN-76 飼料組成<sup>10)</sup>に基づいて N 群の Mg レベルを 0.05%,D 群の Mg レベルを 0.006%に MgO で調整した(Table 1)。

## 3. 赤血球の調製方法

ヘパリン採血し,得られた血液を遠心分離(1000×g,15 分間,4°C)後,上清を血漿成分とした。赤血球画分は Rose らの方法<sup>11)</sup>に従い,0.1mM EDTA を含む生理食塩水で 3 回洗浄し,packed cells を調製後,酵素活性,過酸化リン脂質量およびミネラル濃度の各測定に供した。

## 4. 赤血球,血漿,肝臓,腎臓および

### 心臓中 Fe, Cu, Ca, Mg 濃度の測定方法

血漿および赤血球中の Fe, Cu, Ca, Mg 濃度は硝酸および過酸化水素水にて湿式灰化後,肝臓,腎臓,心臓および大動脈中 Fe, Cu, Ca, Mg 濃度は各組織をマッフル炉(YAMATO Muffle Furnace FP41)にて乾式灰化後,測定検液として各々原子吸光度計(SHIMADZU AA-640-13)を用いて測定した<sup>12,13)</sup>。また,飼料中のミネラル濃度も乾式灰化後,同様に測定を行った。

## 5. 血漿,赤血球,肝臓,腎臓,および

### 心臓中抗酸化酵素活性の測定方法

各組織は,0.25M スクローズ-5mM トリス塩酸混液でホモジネートした後,Sharman ら<sup>12)</sup>の方法に従い 105,000 ×g, 60 分間遠心分離し,得られた上清を採取しサイトゾール分画とした。これを各組織における酵素活性の測定に供した。

血漿,赤血球,肝臓,腎臓,および心臓中の SOD 活性と GPX 活性はそれぞれ亜硝酸法<sup>14)</sup>,Lawrence and Burk の方法<sup>15)</sup>

によって測定した。これらの酵素のタンパク質量は Lowry 法<sup>16)</sup>により分光光度計(HITACHI U-2000 形ダブルビーム分光光度計)にて測定した。

## 6. 血漿,肝臓,腎臓および心臓

### のトリグリセライド(TG)、リン脂質(PL)、総コレステロール(TC)量の測定方法

肝臓,腎臓,心臓の各組織は Folch らの方法<sup>17)</sup>により総脂質を抽出し,各々の測定に供した。また,TG はトリグリセライド E テストワコー,PL はリン脂質 B テストワコー,TC はコレステロール E テストワコー(和光純薬(株))をそれぞれ用い分光光度計にて測定した。

## 7. 血漿,赤血球膜,肝臓,腎臓、

### 心臓および大動脈の過酸化リン脂質量の測定方法

血漿,赤血球膜,肝臓,腎臓,心臓および大動脈の過酸化リン脂質(PCOOH,PEOOH)量は Folch らの方法<sup>17)</sup>により総脂質を抽出し,Miyazawa ら<sup>18,19)</sup>の chemiluminescence-high performance liquid chromatography(CL-HPLC)法に従って

測定した。CL-HPLC の条件は、カラムが Finepak SIL NH2-5(JASCO Corporation),紫外線分光検出器は Shodex UV-4(SHOWA DENKO),化学発光検出器は Shodex CL-2(SHOWA DENKO)を使用した。また,肝臓中の脂質過酸化二次生成物(T thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)量は Kikugawa ら<sup>20)</sup>の方法に従い測定した。

## 8. 尿中 8-OHdG 量の測定方法

8-OHdG の測定には ELISA キット(8-OHdG Check 日研フード株式会社日本老化制御研究所)を使用し,24 時間採取した尿を適時希釈し測定に供した。また,8-OHdG 量はクレアチニン量を