

厚生科学研究費補助金

21世紀型医療開拓推進研究事業

平成13年度 総括・分担研究報告書

日本人の無機質必要量に関する基礎的研究

主任研究者 西牟田 守

平成14（2002）年 3月

目 次

I 総括研究報告書 日本人の無機質必要量に関する基礎的研究 西牟田守	1
II 分担研究報告	
1. 血液中のセレンの分析法の開発及び全血中セレンの分析 玉利 祐三	6
2. フッ素分析法の開発及び尿中フッ素の分析 板井 一好	14
3. 日本人の硫黄（S）必用量に関する基礎的研究 江口 昭彦	22
4. ヨウ素および臭素分析法の開発および食品・食事中の分析 村松 康行	28
5. ICP-MSによる食品中セレンとモリブデンの測定と食品中のセレン含量 吉田 宗弘	36
6. 試料中の微量元素測定法に関する基礎的研究 西牟田 守、湯川 雅枝、大森 佐與子	40
7. 日本人の無機質必要量に関する代謝実験 西牟田 守、菊永 茂司	43
8. 血清中セレン酵素などの測定 平岡 厚	64
9. 日本人成人女性の日常食摂取時のカルシウム出納 上西 一弘	68
10. 安静仰臥時における青年男子のミネラル(灰分、Na、K、Ca、P、Mg、Fe、Zn、S、Cl) およびタンパク質等出納実験 江指 隆年	72
11. 日本人の無機質摂取量に関する基礎的研究 西牟田 守、渡邊 令子	78
12. カルシウム、マグネシウム、リンの摂取量と出納 西牟田 守	90

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）
総括研究報告書

日本人の無機質必要量に関する基礎的研究

主任研究者 西牟田 守（国立健康・栄養研究所 室長）

研究要旨 日本人の無機質必要量を検討するために、各無機質の測定精度を検討したところ、精度管理がなされていると結論されたミネラルは、Na, K, Cl, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Mn, I, Se, Fの14元素であった。Co, Cr, Moの3元素については、生体試料の分析精度が確認できなかった。日本人青年女子12名を対象に海産物を主なセレン給源とした食事を供給し、セレンをはじめとした無機質の消化吸収率を測定する実験を実施した。五訂日本食品標準成分表未収載の無機質のうちS, I, Seの一部の食品中含量を測定した。自由に日常生活を営んでいる高齢者の栄養素等摂取量、特に無機質摂取量を把握することを目的に、地方都市在住の高齢者57名を対象に連続3日間の食物摂取量調査を実施し、成分表を用いて栄養素等摂取量を計算したところ、脂質の摂取量が多くなく、タンパク質、無機質成分の摂取量は平均で所要量を上回った。国立健康・栄養研究所で実施した延べ109名を対象とした出納実験のカルシウム、マグネシウム、リン出納を解析したが、いずれのミネラルも、摂取量と出納の間には有意な関係は見いだされず、摂取量（用量）依存性の出納は否定されたが、見かけの吸収量との関係などから平均必要量(EAR)を算出した。算出されたEARは、関連の低い摂取量と出納の回帰式から得られた値(Ca: 11.75, Mg: 4.548, P: 22.58 mg/kgBW/d)に近いものであった。

分担研究者

江指 隆年	聖徳大学	教授
菊永 茂司	ノートルダム清心女子大学	教授
江口 昭彦	西九州大学	助教授
上西 一弘	女子栄養大学	講師
板井 一好	岩手医科大学	講師
玉利 祐三	甲南大学	助教授

A. 研究目的

国民の健康を維持増進させるための食生活ガイドラインを作成するためには、科学的根拠をもったデータの集積が必須である。

無機質の必要量に関する科学的情報の問題点は、当該物質の測定が精度よく行われていることと、実際に人を対象に実施したデータがあり、それをもとに必要量などが決定されることである。

本研究班は、現在必須性が認められている16の無機質(Na, K, Cl, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Cr, I, Mo, Se)と摂取基準値の策定が求められているFについて、測定の精度について情報を収集し、精度管理がなされている元素については、その方法により、代謝実験で得られた食事・生体試料について測定を行い、必要量決定に資する提供することを第一の目的として研究を実施した。

また、五訂日本食品標準成分表未収載の無機質のうちS, Co, Cr, I, Mo, Seの食事および食品中の含量を測定し、一日の摂取量の推定、摂取に寄与する食品の特定に関する情報を提供することを第二の目的とした。

さらに、特定集団の食事調査および検診を実施し、食事による栄養素等摂取量と健康指標との関係を明らかにすることを第三の目的とした。

また、過去に実施した出納実験のうち、精度管理がなされていると判断した結果について、解析した。

B. 研究方法

- 1) 精度管理について 現在実施されている測定方法（電極法、比色法、原子吸光法、ICP-AES、ICP-MS、放射化分析法）による各種元素の測定に影響をおよぼす因子と測定精度について検討した。
- 2) 人を対象とした代謝実験 青年女子を被験者として、血液及び尿中の無機質レベルの日内リズムを検討した。また、同一被験者を対象に、朝食にバター60g と鶏卵（ゆで）300g（エネルギー過剰食）を摂取させ、血液及び尿中指標の変動を観察した。日本人青年女子12名を対象に海産物を主なセレン給源とした食事を供給し、セレンをはじめとした無機質の消化吸収率を測定する実験を実施した。さらに、青年女子または男子を対象にミネラル等の出納実験を実施し、摂取量と出納との関係を調べた。
- 3) 食事調査と健康指標 自由に日常生活を営んでいる高齢者の栄養素等摂取量、特に無機質摂取量を把握することを目的に、地方都市在住の高齢者（73～74歳：昭和2年生）57名（男31名、女26名）を対象に連続3日間の食物摂取量調査を実施し、五訂日本食品標準成分表を用いて計算し、検討した。
- 4) 出納実験の解析 過去に実施した出納実験のうち、実験の方法、測定方法の精度管理がなされているものを対象に摂取量と出納に関する解析を実施した。
（倫理面への配慮）
 - 1) 本研究は、国立健康・栄養研究所の倫理委員会規約第6条に基づき、審議を経て承認された後に、ヘルシンキ宣言、および、本研究倫理委員会規定に従って実施するほか、各研究施設の倫理委員会規定に従って実施した。
 - 2) 被験者に対しては、あらかじめ実験の主旨、方法、実験に参加することの不利益、苦痛を説明し、被験者の自由意志でいつでも実験から離脱できることを文書で保証した後、文書による被験者の実験参加同意を得て実施した。
 - 3) 各日常生活は、予備実験を行い、あらかじめ験者が体験し、過剰な負担にならないように配慮した。
 - 4) 取得されたデータは、基本的には全被験者の傾向を求めるような処理にかけ、また、個人名は研究者が管理し、データの管理は別に定める記号により行った。
 - 5) 採取した血液等は、必要な検査項目を測定した後、

血清は冷凍保存するが、血球成分等は速やかに廃棄し、遺伝子分析は行わなかった。

C. 研究結果

- 1) 精度管理について 測定試料の前処理を含めて精度管理を検討した。その結果、前処理法を含めて精度管理がなされ、データとしての信頼性のある無機質の種類とその方法について一部の結論を得た。前処理を含めて測定の精度管理がなされていると結論されたミネラルは、Na, K, Cl, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Mn, I, Se, Fの14元素であった。Co, Cr, Moの3元素については、生体試料の分析精度が確認できなかった。このうちMoに関してはICP-MSによる測定法の検討が続行中であり、Co, Crに関しては、放射化分析法とICP-MSによる測定法の検討が続行中である。いくつかの食品中のI, S, Seの濃度について報告された。
- 2) 人を対象とした代謝実験 尿中ミネラル排泄の日内変動は、Pを除き、午前から上昇し、夜間に低下する日内リズムが存在した。Pは早朝から午前中に低値を示した。朝食時にエネルギー過剰食を摂取させても、尿中ミネラル排泄は対照日と同様な変動であったが、血清のGOT, GPT, ALP, LDHなどが有意に上昇した。出納実験で使用した食事献立の五訂成分表による計算値と同一献立で4回作成した食事のミネラル含有量（分析値）との関係を分析し、ZnとCuは同一献立でも含有量が異なる場合があること、Cu分析値と計算値とは大きく異なる場合があることが明らかとなった。また、同一食事内容であっても尿中排泄量の個人間変動が大きいこと、Fの場合、献立によって尿中排泄量が大きく異なること、多量に摂取した場合に24時間では排泄されないことが明らかになった。また、血清中のセレン酵素（グルタチオンペルオキシターゼ）の濃度は実験期間中有意な変化を示さなかった。なお、本年度に実施した出納実験の最終結果は今後明らかにする予定である。
- 3) 食事調査と健康指標 第六次改定日本人の栄養所要量と比較すると男女とも平均摂取量ではすべての栄養素で充足されており、たんぱく質摂取量は男性 $1.8 \pm 0.4 \text{g/kg}$ 、女性 $1.5 \pm 0.4 \text{g/kg}$ で

平均必要量(EAR)の約2倍であった。カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、鉄、亜鉛、銅と、多くのビタミン摂取量は、エネルギー摂取量とよりもたんぱく質摂取量と強い正相関を示した。さらに、灰分から食塩相当量を減じた値は、カリウム、マグネシウム、リン、鉄、銅の摂取量と特に強い正相関を示し、またカリウム摂取量はマグネシウム、リン、鉄摂取量とも強く相関することが確認できた。今後、健康指標との関連を明らかにする予定である。

- 4) 出納実験の解析 国立健康・栄養研究所で実施した延べ109名を対象とした出納実験のカルシウム、マグネシウム、リン出納を解析した。このうち12名のデータは、試料の前処理が不完全で、リンの測定結果は定量性に問題あることが判明し、データから除外したので、リンの解析対象は97名であった。それぞれの元素の出納が0となる摂取量を回帰直線から求めたところ、カルシウム、マグネシウム、リンのいずれのミネラルも、摂取量と出納の間には有意な関係は見いだされなかった。いずれのミネラルも摂取量と見かけの吸収量、見かけの吸収量と尿中排泄量、出納と見かけの吸収量がそれぞれ相関することから、間接的に出納をゼロにする摂取量(EAR)を算出すると、摂取量と出納との回帰式から得られた値(Ca: 11.75, Mg: 4.548, P: 22.58 mg/kgBW/d)に近い数値が得られた。また、摂取量と出納との間に用量依存性がないことから、標準偏差は求められなかった。

D. 考察

- 1) 測定方法について 本年度は3年の研究期間の初年度に当たり、食品・食事・生体試料の精度管理を実施した。その結果、現在の測定精度で研究を実施できるミネラルは、Na, K, Cl, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Mn, I, Se, Fの14元素であった。Co, Cr, Moの3元素については、生体試料の分析精度が確認できなかった。このうちMoに関してはICP-MSによる測定法の検討が続行中であり、Co, Crに関しては、放射化分析法とICP-MSによる測定法の検討が続行中である。次年度以降に測定方法を開発し、日常食でのそれらの摂取量に関する評価を行いたい。成分

表未記載のI, S, Seについて、食品中の濃度が明らかにされた。今後、測定食品数を増加し、データを蓄積させることによって、日本人の五訂未記載成分の摂取量を推定する根拠の一つになると期待される。

- 2) 人を対象とした代謝実験について 本年度は初年度であり、各班員が、それぞれ、人を対象として実施する研究の研究方法等の改良を試みた。出納実験の分析対象元素をNa, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Fの12元素とし、食事の分析対象として、残りの元素を対象とした。同じ出納実験で、超微量元素を含む必須ミネラルを多数同時に測定することが可能になったことは、今後生体内でのミネラル相互間の生物学的影響を解析する上で重要な発展であった。
- 3) 食事調査と健康指標 自立し、質の高い生活を継続しており、健康問題の少ない高齢者の場合、食事による栄養素の摂取量は、平均摂取量ではすべての栄養素で充足されていた。全体では、エネルギー2240kcal、タンパク質/エネルギー比は16%、脂質/エネルギー比は22%、炭水化物/エネルギー比は59%となっており、消費エネルギーが高い(活動量が多い)ことが示唆され、第六次日本人の栄養所要量(所要量)には記載のない生活活動強度IV(高い)かそれ以上の活動を行っていることが示唆される。しかし、脂質/エネルギー比は所要量の範囲であり、摂取エネルギーが多いにも関わらず、脂肪の摂取を控えている食生活が伺える。一方、タンパク質の摂取量も多い。したがって、タンパク質の摂取量と相関の強い、ナトリウム、カルシウム、マンガンを除く成分表記載ミネラルの摂取も所要量を充足させていたと考えた。カルシウムは動物性食品では骨と乳・乳製品が給源となるが、平均で所要量を充足させている。ナトリウムの摂取量は少ない値ではなく、厳密な食塩制限を実施しているものは見られなかった。以上の点から、健康な高齢者の食事は脂肪が少なく、脂肪以外の栄養素とエネルギーが充足されていることが示唆される。なお、ビタミンのうち、A、D、ナイアシン、葉酸の摂取量が許容上限摂取量を超える対象者が存在した。
- 4) 出納実験の解析 109名または97名を対象と

して実施したカルシウム、マグネシウム、リンの出納実験の解析から、摂取量が多くなると出納が正になるという、これまで考えられた出納の用量（摂取量）依存性を支持するような成績は得られなかった。しかし、摂取量と見かけの吸収量、吸収量と尿中排泄量、吸収量と出納との間にそれぞれ相関があることから、出納をゼロにする摂取量 EAR が算出できた。この値は相関の低い摂取量と出納の回帰式から得られた値 (Ca: 11.75, Mg: 4.548, P: 22.58 mg/kgBW/d)に近いものであった。このことから、カルシウム、マグネシウム、リンに関しては、摂取量を確保するとともに、吸収を増加させるような生活条件によって、出納を正に保てるものと考えた。次年度以降に他の元素について検討する予定である。

E. 結論

- 1) 測定方法 現在の測定精度で研究を実施できるミネラルは、Na, K, Cl, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Mn, I, Se, F の 14 元素であった。Co, Cr, Mo の 3 元素については、生体試料の分析精度が確認できなかった。このうち Mo に関しては ICP-MS による測定法の検討が続行中であり、Co, Cr に関しては、放射化分析法と ICP-MS による測定法の検討が続行中である。
- 2) 人を対象とした代謝実験について 出納実験の分析対象元素を Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Mn, Se, F の 12 元素とし、食事の分析対象として、残りの元素を対象とし、出納実験を実施した。
- 3) 食事調査と健康指標 自立し、質の高い生活を継続しており、健康問題の少ない高齢者の場合、食事による栄養素の摂取量は、平均摂取量ではすべての栄養素で充足されていた。
- 4) 出納実験の解析 109 名または 97 名を対象として実施したカルシウム、マグネシウム、リンの出納実験の解析から、摂取量が多くなると出納が正になるという、これまで考えられた出納の用量（摂取量）依存性を支持するような成績は得られなかった。しかし、摂取量と見かけの吸収量、吸収量と尿中排泄量、吸収量と出納との間にそれぞれ相関があることから、出納をゼロにする摂取量 EAR が算出できた。この値は相

関の低い摂取量と出納の回帰式から得られた値 (Ca: 11.75, Mg: 4.548, P: 22.58 mg/kgBW/d)に近いものであった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishimuta M, Kodama N, Yoshioka YH, Morikuni E: Magnesium intake and balance in the Japanese population. In: Rayssiguier Y, Mazur A and Durlach J eds, *Advances in Magnesium Research: Nutrition and Health*, 2001 John Libbey & Co Ltd, pp. 197-200
- 2) Neludu SC, Nishimuta M, Yoshitake Y, Toyooka F, Kodama N, Kim CS, Maekawa Y, Fukuoka H: Magnesium homeostasis before and after high intensity (anaerobic) exercise. In: Rayssiguier Y, Mazur A and Durlach J eds, *Advances in Magnesium Research: Nutrition and Health*, 2001 John Libbey & Co Ltd, pp. 443-446.
- 3) K. Itai and H Tsunoda, Highly sensitive and rapid method for determination of fluoride ion concentrations in serum and urine using flow injection analysis with a fluoride ion-selective electrode., *Clinica Chimica Acta*, 163-171, 2001
- 4) Hiraoka A, Seiki K, Oda H, Eguchi N, Urade Y, Itaru Tominaga & Hori K: Charge microheterogeneity of β -trace protein (lipocalin-type prosta glandin D synthase) in the cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders, *Electrophoresis*, 22, 3433-3437 (2001).
- 5) Hiraoka A, Homareda H & Koshiba K: Effects of plant polyphenols on the auto-oxidation of L-ascorbic acid with Cu^{++} , *Bimed Res Trace Elements*, 12, 251-252 (2001)

2. 学会発表

- 1) 板井一好、岡山 明、標準物質中フッ素濃度について、第 72 回日本衛生学会、2002 年 3 月
- 2) 江口 昭彦、西牟田 守、齋藤 寛、有澤 孝吉、宮崎 秀夫、花田 信弘、小林 誠、高齢者における尿中硫黄濃度の研究。第 72 回日本衛生学会総会 (2002. 3. 26-29、津、三重県)
- 3) 平岡厚、菅田晴夫、小柴共一：L-アスコルビン酸の Cu^{++} による自動酸化に対する植物ポリフ

ェノールの抑止効果の検討、第12回日本微量元素学会(2001.7.13、東京)。

4) Hiraoka A, Tominaga I & Hori K: One-step capillary isoelectrofocusing of pro- teins in cerebrospinal fluid and serum of patients with neurological disorders, HPLC
Kyoto 2001 (2001.9.11-14, Kyoto, Japan)

4) 平岡厚、富永格、堀宏治：ワン・ステップ式キャピラリー等電点電気泳動による神経疾患の患者脳脊髄液及び血清中の蛋白質の分析、第21回日本分析化学会キャピラリー電気泳動シンポジウム
(2001.12.13, 神戸)

5) 平岡厚、加藤庸介、堀井春奈、清木興介、織田浩司、江口直美、裏出良博、富永格、堀宏治：神経疾患の患者脳脊髄液及び血清中のビリルビン及びその酸化生成物バイオピリンの定量、第12回生物試料分析科学会(2002.2.23、横浜)

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進事業）

分担研究報告書

血液中のセレンの分析法の開発及び全血中セレンの分析

分担研究者 玉利 祐三 甲南大学 助教授

研究要旨 必須ミネラルであるセレン（Se）の必要量を検討するために、食品および生体試料中の Se 測定法を開発した。本法は共存物質の影響を受けにくい方法であった。この方法を用いて、高齢者の血中 Se 濃度を測定し、男女の合計 384 検体について算術平均値を算出すると 174 ± 31 ng/g となり、セレン含量の分布は 94~331 ng/g の範囲であり、中央値は 173 ng/g であった。

A. 目的

セレンは、体内で生じた過酸化脂質や過酸化水素による細胞膜の酸化障害を防ぐという抗酸化作用を示す酵素グルタチオンペルオキシターゼ (GPx: EC 1.11.1.9) の構成成分であることが知られている[1]。セレンが生体必須微量元素と認識される一方、セレンの過剰摂取による毒性として呼吸困難、下痢、脱毛、慢性皮膚炎、呼吸障害による死亡等があげられる[2]。セレン欠乏では、中国の克山病 (Keshan disease) のように、特に乳児や母親に突然発症する心筋梗塞、心不全、心原性ショックによる死亡が見られる[2, 3]。中国の調査によれば、克山病発症地域住民の食事中的セレン含量が低いこと、血液中のセレン含量が低いことが指摘されている[2]。また、完全静脈栄養の患者で血清、血球

中のセレン濃度の低下と、赤血球中 GPx 活性の低下が認められている[2]。

ヒト血漿中のセレン濃度と血漿 GPx 活性の間には正の相関があることも指摘されている[4, 5]。乳児用調製乳にセレンを亜セレン酸塩として添加すれば、それを摂取した乳児の血漿中のセレン濃度及び GPx 活性は増加することも報告されている[6]。また、低セレン含有人工乳を授乳される新生児は血漿や全血中の低セレン濃度と低 GPx 活性の両方を導くことも明らかにされている[7]。従って、血液中のセレン濃度及び GPx 活性は、セレンの摂取量に依存することになる。

一般に血液中のセレン含量は 100~400 ng/g レベル (Table 1 参照) であり、そのため低濃度セレンが分析対象となる。Watkinson 法は生体試料中の低濃度セレンが定量できる高感度な蛍

光分析法であるため繁用されてきたが、測定溶液中の極微量の有機物による妨害、あるいは共存する多量の無機鉄などによる蛍光定量に対する干渉が認められるため大きな分析誤差が生じ、正確な分析法とは言えない[8, 9]。そのため著者らにより、改良蛍光法(改 Watokinson 法)が開発されてきた[9]。蛍光分析より分析感度は多少劣るものの、水素化物生成原子吸光法(HG-AAS)がセレンの分析法として推奨される。この分析法は、試料マトリックスから極微量のセレンを水素化物として分離後に検出するため、蛍光法よりも正確かつ迅速簡便な方法である。Table 1にはこれまで報告されてきたヒト血液中のセレン含量をまとめたが、その多くは蛍光法が適用されている。そのため分析され報告されたセレン含量が試料の個体差によるものか、分析法の誤差によるものかは判断できない。また、報告者の多くが蛍光法の精度管理の検討に標準試料 Bovine liver (Se: 1100 ng/g)を用いているが、実際の血液中のセレン含量は、その10分の1程度であるため、精度管理のための標準試料として Bovine liver は不適當である。この場合、むしろセレン含量が同程度の標準試料を使用すべきである。本研究では、これまで報告されてきたセレンの分析法を検討し、迅速簡便でしかも高精度のセレンの分析法としてHG-AASを選定した。しかし、本法でセレンを定量するとき、全血中の鉄マトリックスの顕著な妨害が認められたため、試料溶液中

のセレンから鉄を分離除去するか、分離せず共存鉄をマスクするかの選択が必要であった。本法では、迅速簡便性を考慮した結果、マスク法を選択した。この場合、鉄をマスクするにはEDTA-フッ化ナトリウム混合溶液に十分な効果が認められた。

開発した本法を新潟老人血液(384検体)に適用し、全血中のセレン含量を考察した。

B. 研究方法

1. 試薬：精製水：水道水をイオン交換樹脂及び活性炭カラムで処理し、更に石英製の蒸留器で2回蒸留したものをを用いた(以下、水とする)。

セレン(IV)標準溶液：金属セレン(和光純薬製、純度99.999%)0.1gに硝酸(61%)2ml及び過塩素酸(60%)2mlを加えホットプレート上で加熱溶解し、過塩素酸白煙が生じてから数分間、乾固しないように加熱濃縮した後、セレン(VI)をセレン(IV)に還元するために塩酸5mlを加えて3分間煮沸した。冷却後、水を加えて100mlとした(1000ppm保存溶液)。

テトラヒドロホウ酸ナトリウム(0.75w/v%)溶液：テトラヒドロホウ酸ナトリウム(和光純薬製)3.75g及び水酸化ナトリウム0.5gを水に溶解し500mlとした。なお、この溶液は実験の直前に調製した。

塩酸、硝酸、過塩素酸、硫酸は、すべて精密分析用試薬(和光純薬製)を、その他の試薬は特級品をそのまま用

いた。

2. 装置：セレンの分析には、原子吸光光度計（日立製 Z-6100）及び水素化物発生装置（日立製 HFS-3）を使用した。なおセレンの最適測定条件を Table 2 に示す。

3. 試料：新潟市内在住の高齢者（昭和 2 年生まれの 73～74 歳）438 人について栄養調査とともに 2001 年度に採取した血液 384 検体を試料とした。

4. 分析方法：全血液（0.1～2 g）を正確に秤量し、これを硝酸一過塩素酸を用いて加熱分解した。この試料分解操作（酸の種類と加熱温度による影響）によるセレンの分析誤差の詳細は既報のとおりである[10]。血液試料の分解操作の詳細を以下に示す。

酸分解処理：全血試料（0.1～2 g）をビーカー（50 ml）にとり、硝酸 3 ml 及び過塩素酸 2 ml を加えて、ホットプレート上（約 200℃）で加熱分解し、蒸発乾固させることなく過塩素酸白煙が生じ、なお数分間乾固させることなく加熱濃縮（約 1 ml）した。ただし、加熱による蒸発乾固を防ぐため、分解中に硝酸及び過塩素酸を適宜添加し、溶液全容をほぼ 1 ml 程度に保持しながら分解処理した。

セレンの還元処理：試料分解溶液に 6 mol/l 塩酸 2 ml を加え、ホットプレート上で 3 分間煮沸し、溶液中の全セレン(VI)をセレン(IV)に還元した。放冷後 0.1 mol/l EDTA-NaF 溶液 2 ml を加え全容を 10 ml とし、これを測定溶液とした（1.2 mol/l 塩酸溶液）。

C. D. 研究結果及び考察

1. セレン定量に及ぼす血液中の共存元素による影響

全血 0.1～2 g を採り、酸分解・還元処理しマスキング剤（EDTA-NaF）を添加せずにそのまま定量したところ、分析試料としての血液量 0.8 g まではセレン含有量がほぼ一定となったが、それ以上の試料量 2 g ではセレンの定量値が約 2 分の 1 の低値を示し、血中の共存成分による影響が明らかとなった（Fig. 1 参照）。全血を分析試料としているため、試料分解溶液には主要な無機成分としてナトリウム 3.3 mg/l、塩化物イオン 3.7 mg/l に次いで鉄 0.5 mg/l が存在する。HG-AAS でセレンを定量する場合、共存鉄の影響が顕著であり、それを有効にマスクする方法として 0.1 mol EDTA-NaF 混合溶液が報告されている[11]。本法では、血液分析にそのマスク法を適用した。

2. 本法でのセレンの添加回収率

全血 0.75、1 及び 1.5 g のそれぞれにセレンを 200 ng 添加し、本法でのセレンの回収率を求めた。その結果を Table 3 に示す。各試料量でのセレンの回収率はそれぞれ 97.5、96.5 及び 98.3 % であり、全平均では $98.3 \pm 2.4\%$ （ $n=7$ ）となり満足しうる結果が得られた。また、本法で全血を用いて標準添加法を行ったところ、検量線と標準添加した線の傾きはほぼ平行となったことから、妨害成分の影響なしにセレンが定量できることが確認できた（Fig. 2 参照）。

3. 本法での分析試料量の影響

分析に用いる試料量のセレン定量に及ぼす影響を検討するため、本法で全血 0.1~1.5 g と試料量を変化させ、それぞれの分析値をもとめた。Table 4 に示すように本法では分析試料量に影響されることなくセレンが定量できることが分かった。なお、本法の分析精度は、Table 4 に示すように 194 ± 12.8 ng/g (n=8) となり、その相対標準偏差は 6.6 % と算出されたことから、微量分析としては極めて高精度な方法であることが確認できた。

4. 全血中のセレン含量

新潟市内在住の高齢者（昭和 2 年生まれの 73~74 歳）の全血 384 検体について本法によりセレン含量を求めた。結果を Table 5 に示す。男性 208 検体ではセレン含有量の範囲は 94~331 ng/g、中央値 175 ng/g、算術平均値 176 ± 33 ng/g となった。女性 176 検体ではセレン含有量の範囲は 99~256 ng/g、中央値 171 ng/g、算術平均値 172 ± 27 ng/g となった。男女それぞれの中央値と算術平均値はほぼ一致することから男女ともに正規分布を示し、そのため代表値として算術平均値で示すことにした。また男女の間に有意な差は見出せなかったため、男女の合計 384 検体について算術平均値を算出すると 174 ± 31 ng/g となり、セレン含量の分布は 94~331 ng/g の範囲であり、中央値は 173 ng/g であった。

E. 結論

セレンの栄養状態を把握するために、生体試料中のセレン濃度の定量法

を開発した。この方法を用い、新潟在住の高齢者の血中セレンを測定したところ、93-331 ng/g の範囲であり、中央値は 173 ng/g であり、ほぼ基準値内に分布していた。

文献

1. Rotruck JT, Popo AL, Ganther ME, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG: Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**: 588-590, 1973.
2. 高木洋治、山東勤弥、李 鐘甲、根津理一郎、岡田 正：栄養療法とミネラル・微量元素。鈴木継美、和田 攻編：ミネラル・微量元素の栄養学。第一出版、東京、1994、154 頁。
3. 和田 攻、真鍋重夫、北川泰久、石川晋介、長橋 捷：微量元素の欠乏症。木村修一、左右田健次編：微量元素と生体。秀潤社、東京、1991、89 頁。
4. Wu J, Xu GL: Plasma selenium content, platelet glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity of residents in Kashin-Beck disease affected area in China. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **1**: 39-43, 1987.
5. Ahmed HM, Lombeck I, El-Karib AO, El-Amin EO, Menzel H, Fresh D, Leichsenring M, Bremer HJ: Selenium status in Sudanese children with protein-calorie malnutrition. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **3**: 171-174, 1987.
6. McGuire MK, Burgert SL, Milner JA, Glass L, Kummer R, Deerling R, Boucek R, Picciano MF: Selenium status of infants is

influenced by supplementation of formula or maternal diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**: 643-648, 1993.

7. Kumpulainen J: Selenium: requirement and Supplementation. *Acta P_diatr Scand Suppl.* 351: 114-117, 1989.

8. 玉利祐三、茶山健二、辻 治雄：極微量セレンの分析に関する問題点。*Biomed. Res. Trace Elements* **4**: 263-270, 1993.

9. Tamari Y : Methods of analysis for the determination of selenium in biological, geological and water samples. Frankenberger WT and Engberg RA (ed): *Environmental Chemistry of Selenium.*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel,

Hong Kong, 1998, pp.27-46.

10. 玉利祐三：水素化物生成原子吸光法による生物試料中のセレンの分析。試料溶解法による影響。 *Biomed. Res. Trace Elements* **10**: 125-133, 1999.

11. 玉利祐三：水素化物生成原子吸光法による岩石中の微量セレンの定量、分析化学（投稿中）。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録情報 なし

Table 1 Japanese blood selenium content determined by fluorometry

Sample	Plasma	Erythrocyte ng/g (Mean ±SD)	Whole blood	Fluorometric method	Accuracy	Reference
Male (n=28)	127 ± 18	250 ± 41		Watkinson	NBS Bovine liver	1) Hongo et al. (1985)
Female (n=20)	131 ± 11	326 ± 52		Watkinson	NBS Bovine liver	1) Hongo et al. (1985)
Male (n=104)	110 (90-136)	261 (202-337)		Watkinson	NBS Bovine liver	2) Yoshida (1991)
Male (n=84)	111 ± 19 (65-157)	244 ± 50 (161-431)		Watkinson	NBS Bovine liver	3) Imai et al. (1990)
Female (n=145)	107 ± 16 (87-170)	235 ± 36 (155-338)		Watkinson	NBS Bovine liver	3) Imai et al. (1990)
Male (n=304)	127 ± 23 (49-238)	244 ± 50 (161-431)		Michie		4) Deguchi et al. (1991)
Female (n=223)	111 ± 16 (82-178)	235 ± 36 (155-338)		Michie		4) Deguchi et al. (1991)
Female (n=25)	130 ± 11	310 ± 40		Watkinson	Standard serum	5) Suzuki et al. (1989)
Male (n=10)	120 ± 17			Tamari	Recovery 99.8%	6) Ohmori et al. (1986)
Female (n=10)	112 ± 23			Tamari	Recovery 99.8%	6) Ohmori et al. (1986)
Male (n=143)			132 ± 26			7) Deguchi et al. (1983)
Female (n=219)			121 ± 25			7) Deguchi et al. (1983)
Plasma: interference of ultra trace organic compounds				Tamari	Positive error	8) Tamari et al. (1993)
Sediment and rock: interference of rich iron and org. com.				Tamari	Positive error	9) Tamari et al. (1979)

1) T. Hongo, C. Watanabe, S. Himeno, T. Suzuki: Nutrition Research, 5: 1285-1289 (1985)

2) M. Yoshida: J Jpn Soc Nutr Food Sci, 41: 357-363 (1991)

3) H. Imai, T. Suzuki, H. Kashiwazaki, T. Takenoto, T. Izumi, K. Mōji: 10: 1205-1214 (1990)

4) Y. Deguchi, A. Ogata: Tohoku J. Exp. Med., 165: 247-251 (1991)

5) T. Suzuki, T. Hongo, T. Ohba, K. Kobayashi, H. Imai, H. Ishida, H. Suzuki: Nutrition Research, 9: 839-848 (1989)

6) S. Ohmori, Y. Tamari, A. Okada, Y. Takagi, R. Nezu, Y. Nakajima: Biryō-Kinzoku-Taisha, 14: 129-134 (1986)

7) Y. Deguchi, A. Ogata, M. Nishikawa, K. Yamaguchi, I. Satoh: Igaku to Seibutugaku 07, 55-56 (1983)

8) Y. Tamari, K. Cyayama, H. Tsuji: Biomed Res Trace Elements, 4: 263-270 (1993)

9) Y. Tamari, K. Hiraki, Y. Nishikawa: Bunseki Kagaku, 28: 164-169 (1979)

Certified value of Se: 1100 ng/g for NBS SRM-1577 Bovine liver; 80 ng/g for NBS SRM-1571 Orchard leaves

Table 2 Instrumental conditions for selenium analysis

AAS (Hitachi, model Z6100)

Wavelength of a hollow cathode lamp (HCL)	196.0 nm
Electric current of HCL	12.5 mA
Slit	1.3 nm
Acetylene pressure	10 kPa (1.2 L/ min)
Air pressure	160 kPa (15 L/ min)
Burner height	15.0 mm

Hydride generation apparatus (Hitachi, model HFS-3)

Atomizer	Quartz cell
Acid carrier	1 mol/l HCl
Reducing reagent	0.75 w/v % NaBH ₄ (0.1% NaOH)
Sample solution	0.1~5 mol/l HCl
Detection limit	0.3 ng Se/ml

Table 3 Recovery of standard selenium added from whole blood samples

Sample taken (g)	Se added (ng)	Se found (ng)	Recovery (%)
A: 0.750	0	148	
A: 0.750	200	343	97.5
B: 1.05	0	76.7	
B: 1.05	200	268	95.5
B: 1.05	200	271	97.0
B: 1.05	200	271	97.0
Av ±SD (n=3)			96.5 ± 0.9
C: 1.43	0	262	
C: 1.43	200	458	98.0
D: 1.50	0	147	
D: 1.50	200	346	100
D: 1.50	200	353	103
Av ±SD (n=3)			100 ± 2.5
Total average ±SD (n=7)			98.3 ± 2.4

To the sample solution 2 ml of 0.1 mol/l EDTA-NaF were added and were diluted to 10 ml (0.6 mol/l HCl).

Table 4 Analytical results of selenium in whole blood samples

Whole blood sample taken (g)	Se conc. (ng/ml)	Se content (ng/g)
0.107	1.90	178
0.133	2.61	196
0.266	5.05	190
0.399	7.77	195
0.533	10.5	197
0.799	15.4	193
1.065	23.7	222
1.430	26.2	185
		Av. 194 ± 12.8 (n=8)
		RSD 6.6%

Selenium concentration was measured in a 10 ml solution.

Table 5 Selenium content of whole blood in 384 old people samples

Old people (73~74 years old)	Se content (ng/g)		
	Range	Arithmetic mean±SD	Median
Male (n=208)	94~331	176±33	175
Female (n=176)	99~256	172±27	171
Total (n=384)	94~331	174±31	173

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進事業）

分担研究報告書

フッ素分析法の開発及び尿中フッ素の分析

分担研究者 板井 一好 岩手医科大学 講師

研究要旨 フッ素は必須ミネラルとは認められていないが、米国などでは、食事による摂取基準値が定められている。しかし、食品や生体試料の測定法が確立していないので、これを確立した。この方法を用い、食品中の含量や、出納実験の尿中フッ素排泄量を測定したところ、食品（食事）により、大きく異なった。

A. 目的

フッ素は必須ミネラルとしては認められていないが、齲歯予防効果があり、歯科領域ではその目的で用いられている。また、公衆衛生的立場から、齲歯予防を目的として、水道水にフッ素を添加している国も存在する。一方飲料水中のフッ素濃度が高い地方ではフッ素の過剰症状として斑状歯の発生を生ずる場合がある。従って、フッ素の一日当たりの摂取基準値を策定することが望まれる。一方、食品や生体試料中のフッ素の測定法に関しては、改良すべき点が多く残されている。そこで、フッ素の測定法を開発し、生体試料測定に応用し、フッ素の摂取基準値を策定する試料を蓄積することを目的として研究を実施した。

B. 研究方法

フッ素の測定法を開発し、食品中のフ

ッ素および出納実験の生体試料についてフッ素を測定した。出納実験の試料は研究班合同の出納実験の試料で、被験者大学生女子 12 名、実験期間 17 泊 18 日のものであり、詳細は別に報告されている。

C. 研究結果

1) フッ素測定法の開発

1. 尿中フッ素濃度測定法

フッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション装置を作成し、この装置を用いて尿中フッ素イオン濃度を測定した。作成した装置の概略を図1に示す。図2にはフッ素イオン電極と比較電極を装着した検出部を示す。

図1に示すように、キャリアー溶液として超純水を用いてプランジャーポンプ (P1) で

1.0ml/min の流速で、また緩衝溶液をポンプ (P2) 0.5ml/min の流速で、さらに 0.125mol/l のリン酸イオンと 5mg/l のフッ素イオンを含む溶液をポンプ (P3) で 0.06ml/min の流速でそれぞれ送液した。なお、緩衝溶液は、1mol/l の酢酸ナトリウム、3mol/l の塩化ナトリウム、1mol/l の硝酸ナトリウムおよび 0.06mol/l の CyDTA を約 900ml の超純水に溶解して 1000ml 定容とした後、0.45 μ m のフィルターで濾過して作成した。フッ素標準溶液は 1000mg/l の標準原液 (和光純薬) を適宜希釈して用いた。

尿試料は 0.02mol/l (pH 5.4) の酢酸ナトリウム溶液で 10 または 20 倍に希釈して、測

定用試料溶液とした。測定はサンプルインジェクターのループ容量を 0.2ml として、オートサンプラーを用いて自動測定を行った。本法では、試料中のフッ素イオン濃度に応じて、図 2 に示した検出部のフッ素イオン電極と比較電極間の電位差がピーク形状で得られるので、そのピーク高さをインテグレータで自動的に測定した。検量線は、0.01 から 0.5mg/l の標準溶液について、その濃度とピーク高さからカーブフィットネスプログラムを用いて 2 次回帰式を求めて作成した。1 つの試料について 2 回測定を行いそのピーク高さの平均を求め、検量線から試料中フッ素イオン濃度を求めた。

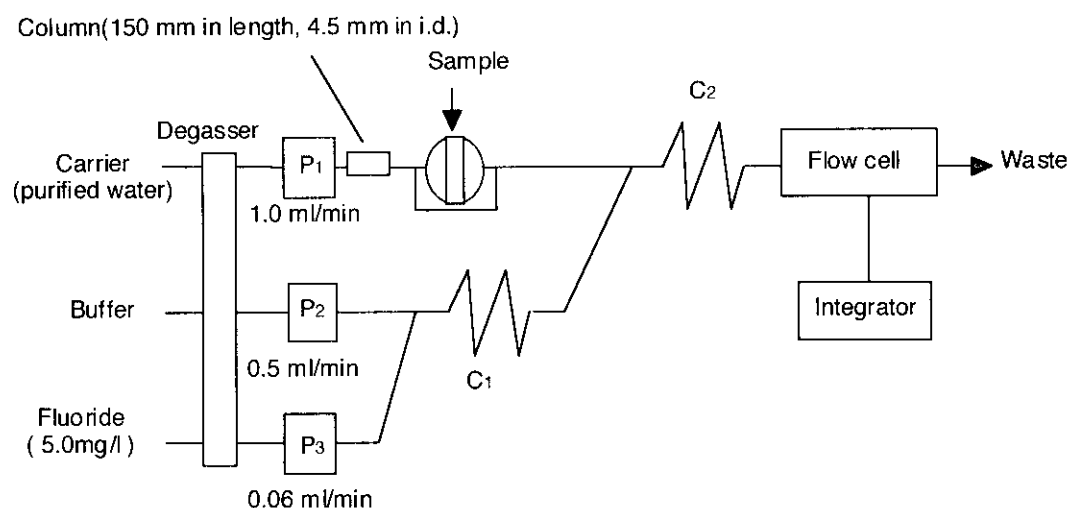


Fig.1 Flow diagram for potentiometric fluoride determination.

P₁, P₂, P₃ : Plunger pumps; C₁, C₂ : Mixing coils

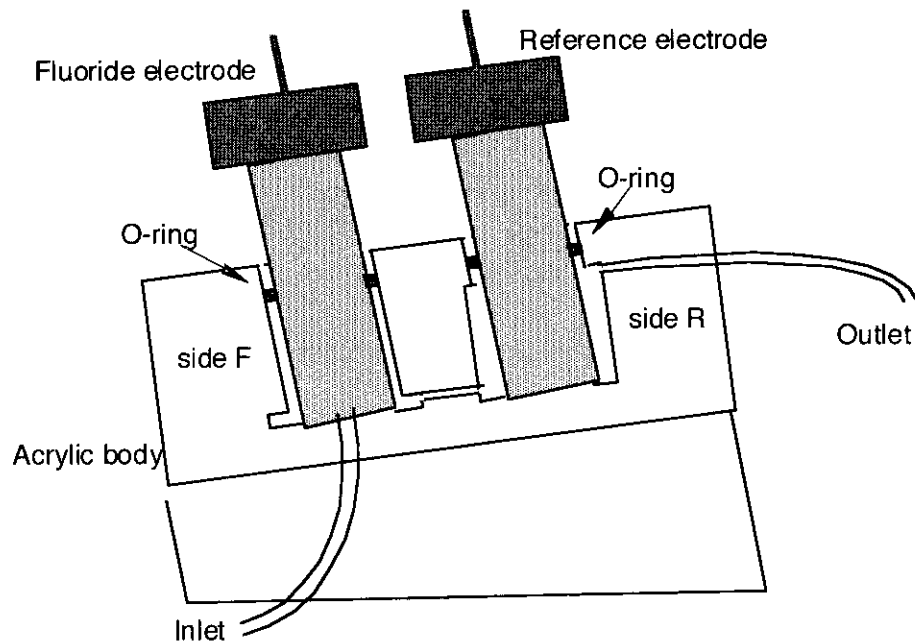


Fig. 2 Flow cell design.

2. 各種試料中総フッ素濃度測定法

固体試料からフッ素回収するために、Pyrohydrolysis を用いて前処理無しに直接試料からフッ素を水溶液中にフッ素イオンとして回収する装置を開発した。開発した装置の概略を図3に示す。燃焼管に外形 20mm、長さ 480mm のアルミナ管を用い、その前部に外径 20mm、長さ 120mm の石英管を連結した。この石英管をコイルヒーターを巻いて 150℃ に加熱し、蒸気の凝縮を防止した。アルミナ管の後部は 90° に曲げた石英管で連結し、さらに石英管で冷却管と連結した。冷却管には 8℃ の冷却水を流した。アルミナ管の前部約 1/3 を内径 23mm、外径 100mm、長さ 120mm の電気炉で 300℃ に加熱し、後部は内径 23mm、外径 100mm、長さ 250mm の電気炉で 1050℃ に

加熱した。酸素ガスは、超純水を入れて 90℃ に維持したフラスコ内を経て酸素ポンペから 1.5l/min の流量で燃焼管内に供給した。

数 mg から数百 mg の試料を正確に白金ボートに秤量して燃焼管前部の石英管部分に置いてガイド棒と連結して密封し、磁石を用いて自動的にゆっくり燃焼管内部の高温部分に導入した。試料中のフッ素は酸素と水蒸気の存在下で試料の燃焼に伴い気化し、直ちに加水分解されてフッ化水素となり、冷却管内で水蒸気とともに冷却されて凝縮水中にフッ素イオンとして回収される。凝縮水中に回収されたフッ素イオン濃度は、フッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析装置で測定し、最終的に試料中フッ素濃度を求めた。

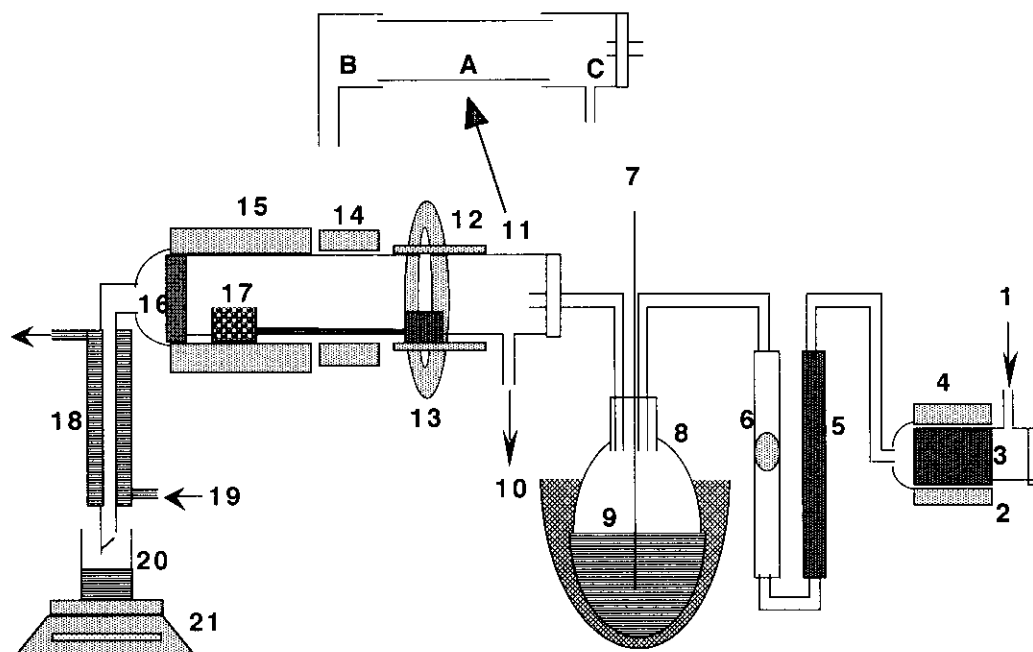


Fig. 3 Diagram showing the apparatus used for pyrohydrolysis

1: O₂ gas, 2: Quartz tube, 3: CuO, 4: Heater (600°C), 5: CuO, 6: Flow meter, 7: Thermometer, 8: Water flask, 9 D-H₂O, 10: Drain, 11: Combustion tube (A: Alumina tube, B,C: Quartz tube), 12: Heater (150°C), 13: Magnet, 14: Subheater, 15: Main heater(1050°C), 16: Platinum gauze, 17: Sample boat (platinum), 18: Condenser, 19: Cooling water, 20: Styrene bottle, 21: Electric scale

3. 尿中フッ素イオン濃度測定 of 精度管理

尿中フッ素イオン濃度の保証値が示されている NIST の尿の標準物質、SRM2671a を用いて精度管理を実施した。低レベルの試料を用いて測定を行った結果は、 0.55 ± 0.01 ($n=10$) で保証値の 0.55 ± 0.03 と極めて良く一致していた。

4. 総フッ素濃度測定 of 精度管理

精度管理上重要な標準物質について、その殆どにフッ素濃度の保証値が示されていない。このため、主に NIST の標準物質について、

精度管理に使用することを目的に、本法を用いてフッ素濃度を測定した。標準物質は全て National Institute of Standards & Technology (NIST) の Standard Reference Material (SRM) を試料として用いた (表 1)。試料 30~150mg を白金ボートに精秤し、フッ素高温気化分離装置 (FIU 1200、大和電子) を用いて、試料中フッ素を水溶液中にフッ素イオンとして分離回収した。回収した水溶液中フッ素イオン濃度をフッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析装置

Figure 1 Fluoride concentrations of NIST Standard Reference Materials.

Materials	N	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/g}$)	(C.V.) (%)
Apple Leaves (SRM 1515)	5	4.45 \pm 0.13	(2.9)
Bovine Liver (SRM 1577)	5	0.115 \pm 0.007	(6.2)
Non-Fat Milk Powder (SRM 1549)	5	0.259 \pm 0.014	(5.3)
Rice Flour (SRM 1568a)	5	0.725 \pm 0.014	(1.9)
Tomato Leaves (SRM 1573a)	5	15.33 \pm 0.08	(0.5)

を用いて測定した。1つの凝縮液について2回測定してその平均値から試料中フッ素濃度を求めた。なお、フッ素高温気化分離装置について、フッ素を水蒸気とともに冷却・凝縮して水溶液中に分離回収する冷却管に改良を加え、冷却管内部のスパイラル管内に外部から 0.1M CH₃COONa 溶液を 0.01 ml/min の流速で送液して、試料中の塩素や硫黄等による凝縮水の pH の低下を抑制した。

NIST の標準物質中フッ素濃度の測定結果について表 1 に示した。測定に供した SRM は Apple Leaves、Bovine Liver、Non-Fat Milk Powder、Rice Flour、Tomato Leaves の 5 種類である。それぞれについて 5 回測定し、その平均値、標準偏差および変動係数 (C.V.) を示した。Bovine Liver の測定結果は 0.115 $\mu\text{g/g}$ と 5 試料中最も低濃度で、生体の軟組

織にフッ素が蓄積しないというこれまでの知見と一致している。Non-Fat Milk Powder については、保証値ではないものの 5 試料中唯一フッ素濃度の参考値 (0.20 $\mu\text{g/g}$) が示されている。本測定法による測定結果は 0.259 $\mu\text{g/g}$ と参考値に近似した値を示した。Rice Flour も 0.725 $\mu\text{g/g}$ と 1 $\mu\text{g/g}$ 以下の濃度であった。植物において葉中のフッ素濃度は比較的高い傾向を示すが、Apple Leaves で 4.45 $\mu\text{g/g}$ と 1 $\mu\text{g/g}$ を越え、Tomato Leaves では 15.3 $\mu\text{g/g}$ と 10 $\mu\text{g/g}$ を越えていた。

測定精度について 5 回の繰返し測定の結果、全てにおいて C.V. が 10% 以下のレベルにあり、最も濃度の低い Bovine Liver でも 6.2 % と良好な結果であった。

2) 食品中フッ素濃度

食品中フッ素濃度についてはこれまで幾つかの報告があるが、測定値が報告によって異なることがあった。板井等が開発したフッ素測定装置は、外部汚染が無く高感度かつ高精度に食物中フッ素濃度の測定が可能である。

この装置を用いて、平成 9 年度国民栄養調査結果から一日平均摂取量が 20 g 以上の食品の中から、穀類と主な野菜類、嗜好品中フッ素濃度を測定した。

試料は一般的に市販されているものを用い