

図1 1日のスケジュール

表1 女子身体的計測値

項目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	8日目
朝 体重 (kg)	57.3±3.5	56.9±3.6	56.6±3.5	56.5±3.6	56.2±3.5	56.2±3.5	56.1±3.4	56.1±3.5
夜 体重 (kg)	57.7±3.6	57.4±3.5	57.3±3.6	57.1±3.6	57.2±3.5	57.0±3.5	56.9±3.5	
朝 身長 (cm)	163.5±3.0	163.8±3.1	163.7±3.2	163.8±2.9	163.6±3.0	163.7±3.1	163.6±3.1	163.8±3.1
夜 身長 (cm)	162.6±3.2	162.6±3.1	162.4±3.0	162.5±3.0	162.5±3.1	162.4±3.1	162.5±2.9	
朝 体温 (°C)	36.35±0.29	36.34±0.23	36.45±0.27	36.61±0.37	36.55±0.35	36.58±0.26	36.42±0.17	36.41±0.16
夜 体温 (°C)	36.47±0.30	36.39±0.27	36.56±0.56	36.46±0.55	36.49±0.57	36.36±0.26	36.17±0.24	
朝 最高血圧 (mmHg)	111.8±10.1	112.6±7.5	107.8±9.3	107.8±4.2	109.4±7.8	105.0±5.8	117.6±9.8	114.8±9.4
夜 最高血圧 (mmHg)	113.8±7.6	108.6±6.1	106.0±8.7	108.6±6.5	109.2±7.0	106.6±3.7	114.4±9.3	
朝 最低血圧 (mmHg)	77.4±10.7	68.6±9.4	69.4±8.7	71.0±7.0	71.4±6.2	69.0±6.9	74.2±5.9	70.4±6.0
夜 最低血圧 (mmHg)	70.0±9.1	67.6±6.3	67.4±5.2	66.0±5.6	65.0±4.0	67.4±5.3	67.2±6.7	
腕 皮下脂肪 (cm)	19.1±3.2						23.2±17.4	
背 皮下脂肪 (cm)	22.7±6.2						18.5±5.3	
総消費量 (kcal)		2244±90	2176±88	2236±85	2179±111	2098±75	2147±86	2156±124

表2 男子身体的計測値

項目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	8日目
朝 体重 (kg)	61.4±7.5	60.8±7.5	60.6±7.5	60.4±7.4	60.4±7.3	60.5±7.2	60.6±7.3	60.6±7.2
夜 体重 (kg)	62.0±7.6	61.7±7.5	61.5±7.6	61.5±7.3	61.6±7.3	61.5±7.2	61.6±7.2	
朝 身長 (cm)	173.2±7.4	172.9±7.5	173.1±7.2	173.1±7.2	173.0±7.1	173.0±7.3	173.0±7.2	173.0±7.3
夜 身長 (cm)	171.7±7.2	171.9±7.3	171.8±7.4	171.8±7.2	171.7±7.2	171.8±7.3	171.9±7.2	
朝 体温 (°C)	36.03±0.29	36.12±0.31	36.13±0.34	36.08±0.21	36.17±0.25	36.18±0.23	36.20±0.32	36.32±0.23
夜 体温 (°C)	36.80±0.32	36.65±0.28	36.48±0.23	36.45±0.21	36.34±0.29	36.38±0.27	36.29±0.30	36.12±0.52
朝 最高血圧 (mmHg)	125.6±17.5	117.8±10.4	112.0±11.0	111.8±9.2	109.6±10.1	109.6±12.1	109.6±12.0	113.6±10.3
夜 最高血圧 (mmHg)	117.2±11.4	115.8±11.3	118.4±11.3	117.0±9.0	113.6±10.4	115.6±12.3	116.2±15.2	
朝 最低血圧 (mmHg)	79.6±12.2	73.4±8.5	70.6±8.0	73.2±6.9	66.8±9.9	68.4±11.2	66.6±10.2	69.4±8.8
夜 最低血圧 (mmHg)	76.2±7.5	61.8±11.6	63.8±14.0	63.4±9.0	56.4±11.8	55.0±12.3	53.4±13.4	
腕 皮下脂肪 (cm)	9.0±3.9						8.8±3.1	
背 皮下脂肪 (cm)	12.0±4.3						11.3±3.5	
総消費量 (kcal)	2523±249	2520±256	2557±238	2549±279	2624±230	2466±228	2328±257	

表3 女子血液一般成分

	3/1	3/4	3/8	傾向
白血球数(/ $\mu\ell$)	5150 \pm 1368 ^a	4180 \pm 733 ^b	3830 \pm 834 ^b	↓
赤血球数($\times 10^4$ / $\mu\ell$)	448 \pm 31	453 \pm 29	438 \pm 31	→
ヘモグロビン(g/dℓ)	13.1 \pm 0.8	13.2 \pm 0.7	12.8 \pm 0.7	→
ヘマトクリット(%)	40.3 \pm 2.3	40.8 \pm 1.7	38.9 \pm 1.8	↓
血小板数($\times 10^4$ / $\mu\ell$)	23.5 \pm 4.8	24.2 \pm 5.5	23.4 \pm 4.9	→
MCV(fℓ)	90.3 \pm 5.5	90.5 \pm 5.4	89.1 \pm 5.3	→
MCH(pg)	29.4 \pm 2.1	29.3 \pm 2.1	29.3 \pm 2.1	→
MCHC(%)	32.5 \pm 0.6	32.4 \pm 0.6	32.9 \pm 0.6	→
総蛋白(g/dℓ)	7.43 \pm 0.24	7.43 \pm 0.23	7.20 \pm 0.24	↓
アルブミン:BCG法(g/dℓ)	4.70 \pm 0.20	4.69 \pm 0.20	4.71 \pm 0.20	→
A/G	1.73 \pm 0.18	1.72 \pm 0.19	1.91 \pm 0.24	↑
GOT(IU/ℓ)	17.0 \pm 2.7	17.2 \pm 2.2	19.0 \pm 2.2	→
GPT(IU/ℓ)	12.0 \pm 1.3	11.1 \pm 1.1	11.8 \pm 2.8	→
γ -GTP(IU/ℓ)	13.6 \pm 1.8	13.3 \pm 2.1	13.4 \pm 2.6	→
クレアチニン(mg/dℓ)	0.72 \pm 0.10	0.73 \pm 0.10	0.70 \pm 0.08	→
グルコース(mg/dℓ)	87.4 \pm 3.8 ^a	86.3 \pm 3.2 ^a	82.0 \pm 3.1 ^b	↓
総脂質(mg/dℓ)	585 \pm 98	570 \pm 86	527 \pm 87	→
中性脂肪(mg/dℓ)	61.3 \pm 28.4	71.1 \pm 32.1	74.2 \pm 38.3	→
総コレステロール(mg/dℓ)	198 \pm 33	190 \pm 30	170 \pm 25	↓
HDL-コレステロール(mg/dℓ)	74.4 \pm 12.9	67.2 \pm 13.2	66.1 \pm 15.0	→
LDL-コレステロール(mg/dℓ)	112.3 \pm 29.8	105.4 \pm 29.6	92.2 \pm 24.7	→
ビタミンB ₁₂ (pg/ml)	656 \pm 193	751 \pm 222	900 \pm 274	↑
葉酸(ng/ml)	11.2 \pm 2.7	13.5 \pm 3.5	13.4 \pm 3.8	→

表4 男子血液一般成分

項目	1日目	3日目	5日目	8日目	傾向
白血球数(/ $\mu\ell$)	5200 \pm 899	4994 \pm 1079	4660 \pm 805	4915 \pm 1717	→
赤血球数($\times 10^4$ / $\mu\ell$)	504 \pm 27	507 \pm 22	494 \pm 28	480 \pm 25	↓
ヘモグロビン(g/dℓ)	15.2 \pm 0.8	15.3 \pm 0.6	14.9 \pm 0.9	14.6 \pm 0.8	→
ヘマトクリット(%)	45.5 \pm 2.5 ^a	45.8 \pm 1.8 ^a	43.9 \pm 2.3	43.2 \pm 2.2 ^b	↓
血小板数($\times 10^4$ / $\mu\ell$)	24.9 \pm 3.6	25.2 \pm 4.1	24.3 \pm 3.3	24.2 \pm 3.6	→
MCV(fℓ)	90.4 \pm 2.6	90.3 \pm 2.8	89.1 \pm 2.7	90.1 \pm 2.7	→
MCH(pg)	30.3 \pm 0.8	30.2 \pm 0.7	30.3 \pm 0.7	30.4 \pm 0.7	→
MCHC(%)	33.5 \pm 0.7	33.4 \pm 0.7	34.0 \pm 0.7	33.8 \pm 0.7	→
総蛋白(g/dℓ)	7.54 \pm 0.37 ^a	7.60 \pm 0.17 ^a	7.43 \pm 0.20 ^a	7.21 \pm 0.13 ^b	↓
アルブミン:BCG法(g/dℓ)	4.92 \pm 0.24	5.06 \pm 0.15 ^a	4.80 \pm 0.14 ^b	4.86 \pm 0.14 ^b	↓
A/G	1.89 \pm 0.14 ^a	2.00 \pm 0.12 ^a	1.83 \pm 0.11 ^a	2.06 \pm 0.17 ^b	↑
GOT(IU/ℓ)	19.9 \pm 6.9	24.4 \pm 8.4	23.4 \pm 8.2	19.8 \pm 3.5	→
GPT(IU/ℓ)	20.3 \pm 11.4	24.1 \pm 15.1	21.2 \pm 10.6	19.4 \pm 10.3	→
γ -GTP(IU/ℓ)	19.1 \pm 6.6	19.9 \pm 5.9	18.6 \pm 5.7	17.4 \pm 4.9	→
クレアチニン(mg/dℓ)	0.80 \pm 0.08	0.83 \pm 0.09	0.82 \pm 0.08	0.80 \pm 0.11	→
グルコース(mg/dℓ)	81.4 \pm 4.0	79.2 \pm 3.7	77.1 \pm 4.2	80.8 \pm 3.8	→
総脂質(mg/dℓ)	534 \pm 92	483 \pm 79	459 \pm 70	441 \pm 62	↓
中性脂肪(mg/dℓ)	79.2 \pm 25.6	62.9 \pm 24.4	71.2 \pm 34.5	78.6 \pm 37.9	→
総コレステロール(mg/dℓ)	170 \pm 32 ^a	160 \pm 27 ^{ab}	145 \pm 22 ^{bc}	131 \pm 21 ^c	↓
HDL-コレステロール(mg/dℓ)	56.0 \pm 13.2	58.8 \pm 11.0	54.8 \pm 10.1	53.4 \pm 10.3	→
LDL-コレステロール(mg/dℓ)	95.2 \pm 22.2 ^a	89.2 \pm 22.5 ^{ab}	74.4 \pm 20.0 ^{bc}	63.4 \pm 16.9 ^c	↓
ビタミンB ₁₂ (pg/ml)	464 \pm 101	470 \pm 82	458 \pm 78	447 \pm 70	→
葉酸(ng/ml)	8.6 \pm 2.7	9.8 \pm 2.3	8.3 \pm 2.2	6.9 \pm 2.0	↓

表5 女子排便記録

被験者	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
a	(11:30)	普通(9:45)	普通(10:46)	(9:31,13:39) 下痢	普通(9:37)	普通(10:04)	
b	普通(14:00)			普通(11:00)	普通(19:00)		
c				普通(午前)	普通(午前)	普通(7:00少 し)(夜少し)	
d		普通(少し)		普通(少し)	普通(19:05) 少し	普通(11:00) 少々	
e	普通		3/3-(生理)	(7:00)下痢	(7:00)軟	(7:00、 15:30)軟	
f	普通(16:00)			普通(7:00)	3/5(生理)、 (6:30)軟	(6:30)軟	(6:30)軟
g	普通(7:00)	3/2-(生理)				(13:40)軟	
h	普通(7:00)		普通(7:00)	(15:00)下痢		(7:00)軟	(7:00)軟
I	普通(夕方)	(7:00)軟	(7:00)軟	普通(7:00)	普通(7:00)	普通(7:00、 11:00)	普通(7:00)
j	3/1-(生理)		普通(7:00)		(7:00)下痢	(7:00)軟	(7:00)軟

表6 男子排便記録

被験者	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	8日目
a	6:43 20:10軟便		6:47軟便 18:28軟便	18:46軟便	6:47軟便	20:44普通	19:23普通	
b			18:58普通	18:51軟便	21:52軟便	18:55普通	19:15軟便	
c	18:23軟便				19:20		6:39	
d	11:00-12:00 普通	11:00-12:00 普通	11:00-12:00 普通	11:00-12:00 普通	11:00-12:00 普通	11:00-12:00 普通	11:00-12:00 普通	
e	21:30かため	20:30下痢	6:43下痢 19:13下痢	7:01下痢 19:13下痢			21:50軟便	6:30軟便
f	18:25普通	20:25やや軟			6:40やや軟	6:40やや軟	22:26下痢	6:27下痢
g	20:00下痢			19:00やや下			18:59軟便	
h	19:30下痢	22:03極少量		21:12軟便	20:40普通			6:52普通
I	10:00			6:30		6:45	6:30軟便	
j	20:07	19:11やや軟	6:30やや軟	18:45やや軟	20:20やや軟	19:25やや軟	19:22やや軟	6:30やや軟少 量

(注)ホテルでの排便は把握できたが、日中の大学での排便は完全には把握できなかった。

厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究報告書

水溶性ビタミンの食事摂取基準の妥当性の検討ービタミンB₁ー

研究協力者 木村美恵子

タケダライフサイエンスリサーチセンター・疾病予防センター 所長

研究要旨

第7次食事摂取基準の策定に資するため、ビタミンB₁摂取基準の妥当性の検討をおこなった。その結果、男女ともに要検討と判断された。

A. 目的

本年度の研究には、第7次栄養摂取基準の策定に資するため、ビタミンB₁必要量に関する human study を行ない、必要量の検討をする。それに先立ち、ヒトけ血液および尿中ビタミンB₁測定法の最も適切なものを再確認することを目的とした。

B. 実験方法

実験方法は、「Human Study の概要」を参照。

血液および尿中ビタミンB₁値は後記IIに示すポストカラム液体クロマトグラフィー(HPLC)-蛍光法により測定した。

C. 研究結果

全血中ビタミンB₁濃度は、実験終了時男子では106±15(pmol/ml)、女子では118±20(pmol/ml)であった。男子で10名中2名が、81, 86 pmol/mlと基準となる90 pmol/mlよりも低い値であった。女子は10名全員が基準となる値よりも高い値であった。

1日尿中へのビタミンB₁排泄量は男子では、実験終了時682±138 nmol/日、女子では503±211 nmol/日であった。男子では全員が基準となる333 nmol/日以上であったが、女子では1名が291 nmol/日と基準となる333 nmol/日より低い値となった。

D. 考察

ビタミンB₁の欠乏実験から判断すると、血液中よりも尿中の値の方が、応答が早い。従って、尿中の値を指標にして判断すると、女子は要検討、男子は妥当であるという結論となる。しかしながら、日本ではビタミンB₁摂取量への応答感度が低いにも関わら

ず、全血液中の総ビタミンB₁が栄養状態の指標として利用されてきた歴史がある。sのため、男子の血液中の値が10名中2名、基準となる値以下であったことを簡単に無視することもできない。従って、要検討と判断した。

E. 結論

男女ともに要検討と判断した。次年度に検討を加える。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

日本ビタミン学会第55回大会
(2003年5月29・30日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 基礎

a. 化学

ビタミン B₁(チアミン thiamin)は天然には、ビタミン B₁ と 3 種のリン酸エステル (thiamin monophosphate : TMP, thiamin pyrophosphate : TPP, thiamin triphosphate : TTP) が存在する。ビタミン B₁ には塩酸塩、硝酸塩などがあり、いずれも白色の結晶で水に溶け、酸、熱などには安定であるが、アルカリ条件では不安定である。ビタミン B₁リン酸塩類はいずれも白色結晶で、ビタミン B₁に比べて、水溶液、熱、アルカリにも不安定で、特に TTP は極めて不安定である。

b. 生合成と代謝

ビタミン B₁およびそのリン酸エステル類は、経口摂取されるとビタミン B₁ はそのまま、リン酸エステル類は消化管内で、ホスファターゼの作用によりビタミン B₁ となって吸収される。そして、生体内で再びそれぞれのエステル類にリン酸化される。糖代謝酵素の補酵素となり生体にとって最も重要な TPP はチアミンキナーゼによりリン酸化される。生体内ではこの TPP が大部分を占め、活性型ビタミン B₁ といわれている。

利用されたビタミン B₁リン酸エステル類はビタミン B₁に変換され、さらに、チアゾール、ピリジンに分解されて、尿中に、一部は胆汁中にも排泄される。ビタミン B₁もそのままの形で尿中に排泄されるものもある。

c. 機能

ビタミン B₁ の作用は TPP が糖代謝酵素 (トランスケトラーゼ, ピルビン酸脱水素酵素, α - ケトグルタル酸脱水素酵素) の補酵素となることである。また、神経における、補酵素以外の特異的な作用が考えられている。

d. 欠乏症と過剰症

ビタミン B₁ 欠乏症にはビタミン B₁ の欠如する精白米を常食とする東洋に多い脚気と西洋に多いウェルニッケ脳症がある。また、幼児に激症型の急性ビタミン B₁ 欠乏症である乳児脚気が発症することがある。脚気の症状は全身倦怠、心悸亢進、心臓肥大、浮腫、最低血圧の低下、四肢の知覚異常、腱反射消失、知覚鈍麻などで、心臓と末梢神経の疾患といえる。ウェルニッケ脳症は中枢神経疾患で眼球運動麻痺、歩行運動失調、意識障害を伴うが、慢性化するとコルサコフ症という精神病に移行する。この両者を一括してウェルニッケーコルサコフ症候群と呼ぶ。本症はアルコールの摂取量の多い者に多発し、アルコール中毒の関与が注目されている。乳児脚気は食欲不振、嘔吐、緑便、筋硬直発作、心障害、チアノーゼが起こり、治療が遅れると 12~24 時間以内に死亡することもある。

ビタミン B₁ の代謝異常症として、次のようなものがある。①ビタミン B₁ を補酵素と

する α -ケト酸脱水素酵素が先天的に欠損していることにより発症するカエデ糖尿病がある。生後1週間以内に嘔吐、けいれん、昏睡などを主症状として発症する。②ピルビン酸脱水素酵素の欠損由来のピルビン酸脱水素酵素欠損症では、嚥下困難、視力障害、けいれん、末梢神経障害などを主症状とする亜急性壊死性脳症である。これらの病気にはビタミンB₁の大量投与が有効である場合がある。ビタミンB₁は大量を投与しても必要量以上は尿中に排泄されてしまうので毒性はほとんどない。

e. 必要量と単位

ビタミンB₁の所要量は、これまでの多くの人体を用いた研究から、エネルギー摂取1,000kcalあたり0.4mgと定められている。平成12年の第6次改定においても、他のビタミンに比較して、大きな変わりはなく、エネルギー摂取1,000kcalあたり0.4mgと定められ、過剰摂取による直接的障害はないと言う観点から許容上限摂取量は取り決められなかった。

f. 摂取の現状

現在、日本の国民栄養調査結果ではビタミンB₁は充足されているとされているものの、国民調査結果でも年毎に摂取量は低下してきており、その他、ビタミンB₁摂取量調査結果からも摂取量は低値で¹⁾、また、溶性ビタミンで調理による損耗が大きく(約40%の損耗)²⁾、摂取不足があると考えられる。

J. 測定法—血液および尿中ビタミンB₁のHPLC測定法—

a. ビタミンB₁測定用試薬

特級 thiamin-HCl (ビタミンB₁塩酸塩)

特級 NaH₂PO₂H₂O (リン酸二水素ナトリウム)

特級 K₃Fe(CN)₆ (フェリシアン化カリウム)

特級 NaOH (水酸化ナトリウム)

特級 CH₃COONa \cdot 3H₂O (酢酸ナトリウム)

特級 CCl₃COOH (トリクロロ酢酸)

タカジアスターゼB (三共株)

活性ビチエンジ (和光純薬)

b. ビタミンB₁測定用試薬調製 (*尿では不要)

ビタミンB₁標準液: thiamin-HCl (M.W. 337.27) 11.2mgをメスフラスコで蒸留水にて10mlにメスアップ後、混和、冷蔵保存→使用時に希釈

5% トリクロロ酢酸 (CCl₃COOH) 溶液*: 50gのCCl₃COOHを蒸留水にて溶解、1000mlにメスアップする

4M 酢酸ナトリウム (CH₃COONa) 溶液*: 54.44gのCH₃COONa \cdot 3H₂Oを蒸留水にて溶解、100mlにメスアップする

1% タカジアスターゼ溶液*: 2g 活性ビチエンジおよび蒸留水 1 mlを入れた蓋つき

小試験管に、蒸留水 1 ml に 20mg のタカジアスターゼ粉末を溶解させた溶液を加え、30分振とう。

混和 (タカジアスターゼ粉末中にわずかに残存するビタミン B₁ を活性ビタチエンジに吸着除去する), 冷却遠沈器 (4° C) にて 10 分遠沈し, その上清を VB₁ 前処理用タカジアスターゼ溶液とする (時に応じ必要量を作成する)

30% NaOH 溶液: 300g の NaOH を蒸留水にて溶解, 1000ml にメスアップする (発熱するので気をつけること, 溶解容器を冷却しながらすることもよい)

1% K₃Fe(CN)₆ : 0.1g の K₃Fe(CN)₆ を 10ml 蒸留水にて溶解 (保存液 A: 冷蔵保存)

反応液 (0.01% K₃Fe(CN)₆ in 15% NaOH) : 保存液 A 0.5ml を 250ml 30% NaOH 溶液にて溶解, 500ml にメスアップする (用時調整)

移動相 (0.2M NaH₂PO₄) : 31.2g NaH₂PO₄·2H₂O を蒸留水にて溶解, 1000ml にメスアップする (用時調整)

4M 酢酸ナトリウムは低温で結晶化する場合があるので室温で保存する. 酢酸ナトリウム以外は 4°C で保存する.

c. ビタミン B₁ 測定用 HPLC のシステム

(1) HPLC ポンプ

(2) 移動相: 0.2M NaH₂PO₄ (流速: 1ml/min)

(3) 注入器

(4) 試料: 100 μl

(5) 分離カラム: Shodex RS-pak NN-614

(6) 反応液送液用ポンプ

(7) 反応液: 0.01% K₃Fe(CN)₆/15% NaOH (流速: 0.8ml/min) (用時調整)

(8) 検出器: 蛍光分光光度計 (励起波長 375nm 蛍光波長 450nm)

(9) 記録計

(10) ドレン

d. 前処理

d-1. 血液

標準品, 血液 200 μl をマイクロチューブに分注する.

ボルテックスミキサーで混和しながら, 5% TCA を 400 μl 添加し, よく混和する.

1300xg で 5 分間遠沈する.

上清 300 μl を分取する.

4M 酢酸ナトリウム 30 μl を添加, 混和する.

1% タカジアスターゼ溶液# 20 μl を添加し, よく攪拌する.

恒温器にて, 37°C で 1 晩 (5~8 時間) 保持する (リン酸塩型 VB₁ をすべてフリー型に変換)

HPLC 測定 (試料 100 μl 注入)

測定までは試料は 4° C で保存する.

フローチャート

血液 200 μl

↓

+ 400 μl 5% TCA

↓

混合 2 min

↓ (ボルテックスミキサーで混ぜながら TCA を入れる)

遠沈 5 min 1300xg

↓

上清 300 μl 分取

↓

+ 4M 酢酸ナトリウム 30 μ l

混合

↓

+ 1% タカジアスターゼ溶液* 20 μ l

混合

↓

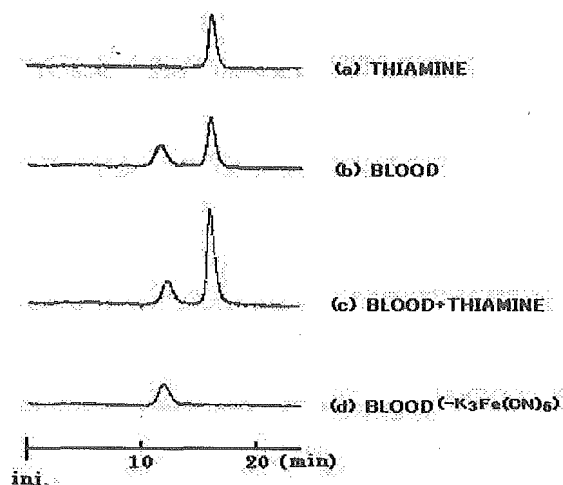
37° C 1 晩 (5-8 時間)

↓

HPLC 測定

(試料 100 μ l 注入)

Chromatogram of thiamine standard and
of human blood sample



*タカジアスターゼ溶液

用時調整

(小試験管)

タカジアスターゼ粉末 20mg + 蒸留水 1 ml

溶解

+ 活性ビタテンジ 2g + 蒸留水 1 ml

↓

振とう 30 min (回転式シェーカー)

↓

遠沈 10 min (4° C)

↓

上清 (VB₁ 前処理用タカジアスターゼ溶液)

d-2. 尿

標準品, 尿を 200 μ l をマイクロチューブに
分注する.

蒸留水にて 5 倍希釈

e. 手順

1. 移動相を作製する.
2. 反応液を作製する.
3. 移動相のポンプの流速を 1.0 ml/min に
設定する.
4. 反応液の送液ポンプの流速を 0.8
ml/min に設定する.
5. 移動相を約 20 分間流して, カラム内の
液を置換する.
6. シリンジでスタンダードを注入し, 測定
する.
7. 前処理した試料を測定する.

f. ビタミン B₁ 測定用 HPLC の条件

蛍光検出器 : 励起波長 375nm 蛍光波長
450nm

移動相 流速 1.0 ml/min

反応液 流速 0.8 ml/min

注入量 : 100 μ l

分析時間 : 10 min

温度条件 : 常温

g. 試料の運搬, 保存

g-1. 血液

ヘパリン採血

冷却または冷凍運搬

冷凍保存 (-20° C 以下)

出来るだけ早く測定に供すること(1ヶ月以内)

g-2. 尿

塩酸酸性下収集

冷却または冷凍運搬

冷凍保存(-20° C 以下)

出来るだけ早く測定に供すること(1ヶ月以内)

h. 参考文献

木村美恵子, 藤田登美雄, 糸川嘉則: 高速液体クロマトグラフィーによる血液中総ビタミン B₁ 定量法 ビタミン 55, 185-189 (1981)

M.Kimura, T.Fujita, Y.Itokawa:

Liquid-chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin Chem* 28, 29-31 (1982)

美濃真: 日本ビタミン学会が推奨する臨床検査検体試料のビタミン測定法 (ビタミン B₁: 木村美恵子) ビタミン 74, 501-513 (2000)

厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究報告書

水溶性ビタミンの食事摂取基準の妥当性の検討—ビタミンB₂—

研究協力者 大石誠子 応用生化学研究所 副所長

研究要旨

第六次改定日本人の栄養所要量として示された量のビタミン B₂ を含む食事を摂取した大学生の男女各 10 名の全血中および血清中の総ビタミン B₂ 量, リボフラビンの尿中排泄量の変動を調べ, 策定された値の妥当性について検討した。

A. 目的

ビタミン B₂ (B₂) は 19 世紀における動物の成長に不可欠な未知の微量因子, 副栄養素に関する研究により, 水溶性で熱に安定な成長促進因子として天然物から抽出され, 1933 年に Kuhn らによってネズミの B₂ 欠乏症の治癒効果をもつ物質として単離された。抽出材料により種々の命名がなされたが, いずれも蛍光性の黄色色素であり, フラビンと名付けられた。その後の構造決定の成績を踏まえて, 1937 年にリボフラビン [(7,8-ジメチル-10-(1'-D-リビチル)イソアロキサジン) (RF) という名称が正式に採用された。RF は B₂ の基本型であり, 細胞に取り込まれた後, 補酵素型フラビンモノヌクレオチド (FMN) あるいはフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) に変換されてエネルギー代謝系, 多くの酸化還元系において作用する。また, FMN や FAD は他のビタミン, ビタミン B₆ の補酵素型であるピリドキサーリン酸あるいはナイアシンの生成に必要である。基本型の RF は体内代謝系ではほとんど活性を示さない。

欠乏症として成長障害, 口角炎や眼膜炎, 脂漏性皮膚炎等がある。ヒトの場合, 日本では現在特別な場合を除き典型的な欠乏症は認められないが, 食生活の変化による要求性の増大, 摂

取不足, 代謝異常, 抗生物質などの薬物投与による利用不全時に潜在性の欠乏症がみられる。また, 癌, 循環器疾患, 糖尿病, 高脂血症等と B₂ 欠乏との関連が報告されている。

摂取後, 食品中の補酵素型は RF まで加水分解されて吸収される。その大部分は近位小腸から飽和型輸送系で吸収され, 摂取量に比例して吸収されるが, 他の食品との同時摂取あるいは胆汁酸の存在により吸収量が増加する。低濃度の場合多くは能動的あるいは促進拡散的輸送系により吸収され, 高濃度の場合は拡散により吸収される。RF は血液中ではアルブミンあるいはグロブリンに結合しており, 妊婦では RF 結合蛋白との結合がみられる。細胞質内で補酵素型に酵素的に転換される。本ビタミンの代謝は RF の体内動態で規定され, 補酵素型への転換は FAD レベルで調節されている。過剰の B₂ は尿中に排泄されて, 体内に蓄積されることはない。尿中排泄の大部分は RF, その他 7-あるいは 8-ヒドロキシリボフラビンを含む種々の形の RF の代謝物である。

B₂ 充足度は, 血液中総 B₂ 量, 赤血球中の総 B₂ 量, 血清中の総 B₂ 量, 赤血球中のグルタチオン還元酵素活性, グルタチオン還元酵素活性に対する FAD 添加効果, 尿中 RF の測定などで判定す

ることができる。従来の栄養所要量の策定にもこれらの値あるいは欠乏症状の回復を認める投与量が考慮された。しかし、いずれもかなり以前の成績あるいは外国人について得られた成績であり、現在の日本人の栄養所要量の策定に際して策定根拠としうる科学的証拠となる成績は必ずしも十分得られておらず、改めてデータの入手と解析が必要であると考えられる。この目的のために、「日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究」が、21世紀型医療開拓推進研究事業の1つとして平成13年度より立ち上げられ、先ず男女の大学生を対象としてデータを得ることとなった。血中および尿中の B_2 量測定法の妥当性および第六次改訂で採用された栄養所要量を投与した場合の血中および尿中の B_2 量を測定し、値の妥当性を検討した。

B. 研究方法

各10名ずつの男子及び女子大学生にそれぞれ1日あたり1.2 mg および1.0 mg のRFが7日間投与された。全血中総 B_2 量、RF、FMN、FAD各量の測定には、氷冷血液1 ml に氷冷水1 ml を加え、氷中5分放置溶血後、 -20°C 凍結保存したものを試料とした。血清中総 B_2 量の測定には血液を 4°C 、3000回転、10分遠心分離した上清を -20°C 凍結保存したもの、尿中のRF量の定量には採取時に尿10 ml に氷酢酸を0.2 ml 加え、 -20°C 凍結保存したものを測定試料とした。いずれも蛍光-HPLC法により測定した(スキーム1, 2, 3)。

C. 結果

1. 全血中ならびに血清中の総 B_2 量

図1に投与期間中の全血中ならびに血清中の総 B_2 量の男女各10名ずつの平均値(±SD)を示す。7日間投与後の全血の総 B_2 濃度の平均値はRF換算で、男子0.216 nmol/ml、女子0.224 nmol/mlであり、血清中総 B_2 量濃度は男子0.076 nmol/ml、女子0.090 nmol/mlであった。いずれの総 B_2 量も、男女ともに期間中ほとんど変動が認められなかった。有意差は認められないが、女子の方が男子に比べいずれも高値であった。全血中の三型 B_2 分別定量の際に得られるHPLC

パターンを1例を図2に示す。定量結果は表1に示す通りで、FAD含量が最も高く、従来の報告と一致する。

2. リボフラビンの尿中排泄量

図3に投与期間中のRFの尿中排泄量の男女各10名ずつの平均値(±SE)を示す。1日あたりの排泄量は個人差は大きいが見る限り投与期間中、男女ともそれ程大きな変動は認められなかった。また、クレアチニンあたりで表示した場合も大きな変動は認められない、男子に比べ女子の方がいずれも高い値を示した。投与7日後の尿中排泄量はmolクレアチニンあたり、男子53 μmol 、女子102 μmol であった。

図4に尿希釈液を注入した場合のHPLCパターンの1例を示す。先の報告の通り、RFのピーク以外に多くの蛍光性物質の排泄が認められる。

投与RF(女子1.0 mg/日;男子1.2 mg/日)に対するRF尿中排泄量の割合は平均値で見ると投与期間中変動は認められず、女子36%、男子23%であった。女子の中にはこの割合が期間中若干変動する例も認められ、また60~80%の値を示す例も認められた。投与期間中のある1日について日内変動をみた結果は男女とも大きな変動は認められなかった。

D. 考察

ビタミン B_2 栄養所要量策定にあたって、必要量を決めるための測定項目としては血中の B_2 量および尿中排泄量が挙げられる。日本人については前述の如く十分な成績が得られていないが、近年、女子大学生を対象として栄養調査を行い、 B_2 摂取量を確認した上で、健常者の血中 B_2 濃度を測定した平岡・安田による成績が報告されている。それによると、被験者193名の B_2 摂取量の平均値は1日1.2 mgであり、その中で、調理損耗を考慮した B_2 充足者の血中 B_2 量は84.8 ng/ml(226 nmol/L)、正規化した分布範囲は62~104 ng/ml、この分布範囲内にある被験者の B_2 摂取量(平均値±2SD)の値は0.72~1.75 mg/日とされた。安全率および調理損耗率を考慮して、第五次改訂栄養所要量と同レベルの数値が得られたと結論されている。今回実施した試験

で得られた結果の中で、第六次改訂栄養所要量に基づいて調製された食事 (B₂: 1日 1.0 mg) を摂取した女子大学生の場合の血中 B₂ 量の平均値は 84.2 ng/ml (224 nmol/L) であり文献の値とほぼ一致していた。また、男子大学生については今回得られた成績が妥当なものかどうかは結論を出しにくいですが、全血溶血液を用いて予備的に検討したグルタチオン還元酵素活性に対する補酵素 FAD の添加効果は 1.14 ± 0.04 であり、充足していると考えられた。また、男女共、血中総 B₂ 量および RF の尿中排泄量の試験期間中の経日的変動の結果からも今回の条件下では充足しているものと考えられた。男女間で有意差はないものの差が認められたことの原因は現在不明である。RF 摂取量に対する RF 尿中排泄量の割合が男女共低い (平均値: 男, 23%; 女, 36%) 点については RF 以外の B₂ 代謝産物および糞中排泄量を検討する必要がある。

E. 結論

今回実施された食事内容および生活状態であれば、健康男子成人および健康女子成人において1日あたりそれぞれ 1.2 mg および 1.0 mg の B₂ 摂取で、B₂ の栄養状態は保たれるものと考えられた。

F. 健康危機情報

特記する情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 口頭発表

日本ビタミン学会第 55 回大会

(2003 年 5 月 29・30 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 ビタミン B₂ 三型分別定量 (μmol/L)

		男子	女子
1	FAD	0.249 ± 0.022	0.186 ± 0.020
	FMN	0.017 ± 0.007	0.021 ± 0.007
	RF	0.0057 ± 0.0005	0.0065 ± 0.0008
3	FAD	0.242 ± 0.017	0.191 ± 0.020
	FMN	0.019 ± 0.007	0.020 ± 0.006
	RF	0.0058 ± 0.0003	0.0064 ± 0.0004
5	FAD	0.236 ± 0.016	-
	FMN	0.018 ± 0.007	-
	RF	0.0057 ± 0.0004	-
8	FAD	0.237 ± 0.022	0.186 ± 0.023
	FMN	0.017 ± 0.007	0.021 ± 0.005
	RF	0.0056 ± 0.0003	0.0066 ± 0.0007

RF: リボフラビン

スキーム1. 全血中総 B₂ 量および血清中総 B₂ 量
(ルミフラビンに転換して測定)

溶血液 0.1 ml (血液 0.05 ml 分)

または

血清 0.05 ml

↓ +蒸留水 0.44 ml (血清の場合 0.49 ml)

↓ +0.5 M H₂SO₄ 0.26 ml

↓ 80°C, 15 分

↓ 冷却

↓ +10%トリクロル酢酸 0.2 ml

↓ 3,000 rpm, 10 分

上清 0.2 ml

↓ +1 M NaOH 0.2 ml

↓ 光分解, 30 分

↓ +氷酢酸 0.02 ml

↓ 0.45 μm filter

HPLC 用試料 (注入量: 50 μl)

蛍光測定

HPLC 条件

カラム: TSK ODS-80 TM (ø 4.6 × 150 mm)

ガードカラム: TSK guardgel ODS-80 TM

溶媒: methanol : 10 mM Na-PO₄ (pH 5.5) = 36: 65

流速: 0.8 ml/min

カラム温度: 40°C

検出: 蛍光 (励起, 445 nm; 蛍光, 530 nm)

スキーム2. 全血中 B₂ 三型分別定量

溶血液 0.4 ml (血液 0.2 ml 分)

↓ +5% NH₄Cl/10 mM Na-PO₄ (pH 5.5) 0.4 ml

↓ 80°C, 15 分

↓ 冷却

↓ 10,000 rpm, 10 分

上清

↓ 0.45 μm filter

HPLC 用試料 (注入量: 20 μl)

蛍光測定

HPLC 条件

溶媒: methanol : 10 mM Na-PO₄ (pH 5.5) = 30:

70

他はスキーム1と同じ

スキーム3. 尿中リボフラビン量

尿試料

↓ 15,000 rpm, 10 分

上清

↓ 0.45 μm filter

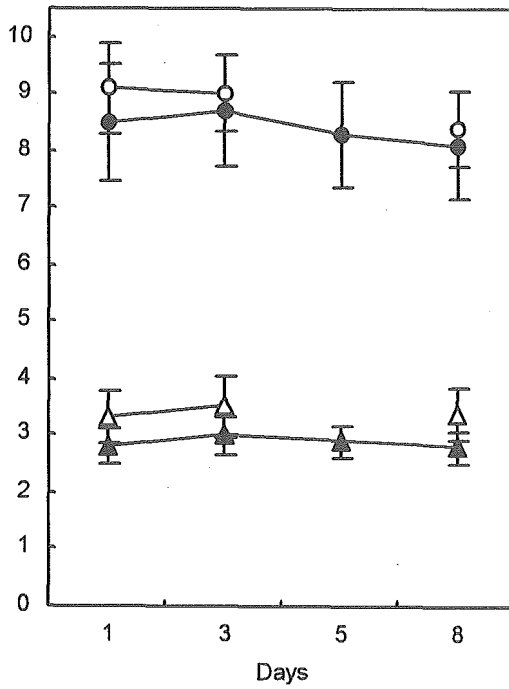
HPLC 用試料 (注入量: 5 μl)

蛍光測定

HPLC 条件

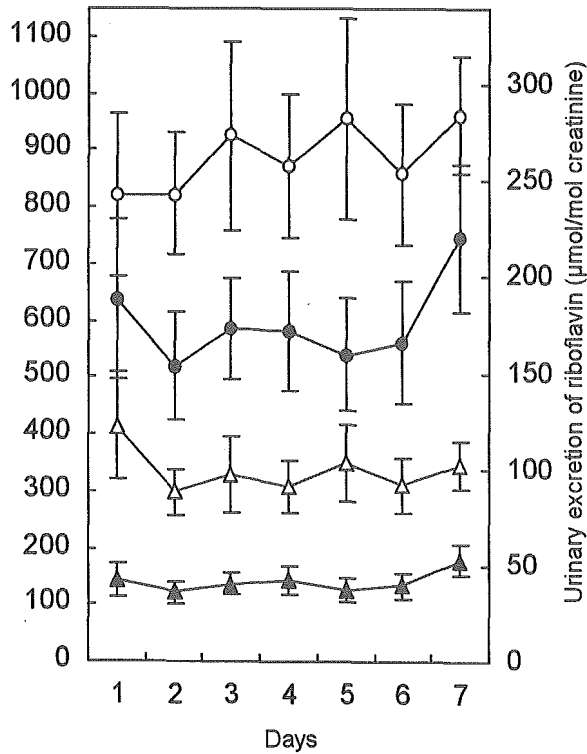
スキーム2と同じ

図1 全血中および血清中の総B₂量



○ 女子 全血; ● 男子 全血
△ 女子 血清; ▲ 男子 血清

図3 リボフラビン尿中排泄量



左縦軸 ○ 女子; ● 男子
右縦軸 △ 女子; ▲ 男子

図2 全血中ビタミン B₂三型分別 HPLC パターン

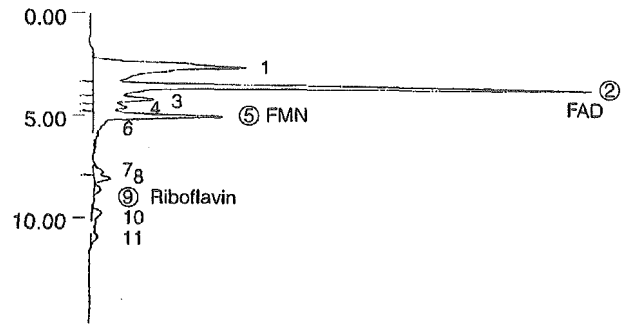
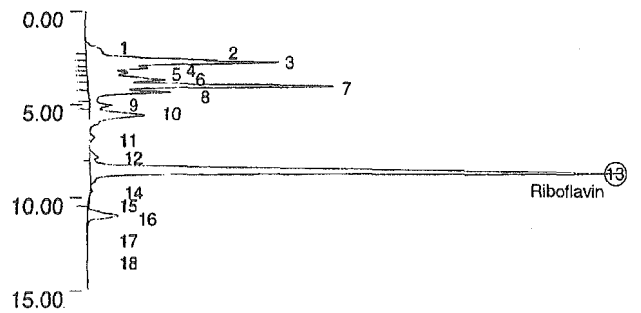


図4 尿中フラビンの HPLC パターン



厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究
主任研究員 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究協力者報告書

水溶性ビタミンの食事摂取基準の妥当性の検討——ビタミンB₆——

研究協力者 柘植治人 岐阜大学農学部 教授
伊佐保香 岐阜大学大学院農学研究科 研究生

研究要旨

第6次改定食事摂取基準に基づき、被験者(男女各10人)に対して、男性被験者には1.6 mg (9.5 μmol)、女性被験者には1.2 mg (7.1 μmol)のB₆(PN)を与えた。生体内のB₆栄養状態は、HPLC法で血清中B₆濃度及び尿中PIC排泄量を測定した。赤血球のASTおよびALTの活性は、市販の測定用キットを用いて測定し、PLP(250 nmol)の添加の有無における活性から活性化率を算出し、評価した。

血清中B₆濃度は、男性122.4 pmol/ml、女性191.7 pmol/mlであり、これまでの健常者で報告されている値と比較すると女性でやや高値を示した。尿中PIC排泄量は男性2.79 μmol/day (0.22 mmol/mol creatinine)、女性3.32 μmol/day (0.72 mmol/mol creatinine)であり、男女ともにPIC排泄量の日内変動は見られなかった。また、摂取B₆量に対するPICの排泄量の割合は、男性33%、女性45%であった。赤血球のASTおよびALTの活性化率は男女とも基準値以内であり、これらの結果からB₆食事摂取基準は妥当であると判断されたが、今回摂取B₆量に対するPIC排泄量の割合がやや低値であったことの原因を検討する必要がある。

1. 基礎¹⁻⁵⁾

1. 発見

ビタミンB₆ (B₆) はネズミに発症する脂漏性皮膚炎の予防因子として、1934年にGyörgyによって発見された。1938年には世界の5つの研究室(Lepkovsky, Keresztesyら、市場・道は米糠から、Kuhnら及びGyörgyは酵母)から塩酸塩の結晶標品を単離したことを報告し、Kuhnらは、これをアデルミン

(Adermin)と命名し、1939年分子式を提示した。その後、1940年代に米国で微生物増殖因子を研究していたSenllらにより、PNより1000倍以上効率的な因子が複数存在することが指摘され、偽ピリドキシンと呼ばれた。ついで、1944年にHarrisらはピリドキサール(PL)とピリドキサミン(PM)の化学合成に成功した。そして、1944年Gunsalusらのデカルボキシラーゼの補酵素(コカルボキシラーゼ)がPLPであること

が分光学的に証明され、ビタミンとしての地位が確立された¹⁾。

2. 名称と性質²⁻⁵⁾

自然界に存在する B₆ 化合物の構造と名称

図-1 自然界に見出される B₆ 化合物の構造と名称

構造	置換基		名称	略称
	R ₁	R ₂		
	-CH ₂ OH	-H	ピリドキシン	PN
		-PO ₄ H ₂	ピリドキシン 5'-リン酸	PNP
	-CHO	-H	ピリドキサール	PL
		-PO ₄ H ₂	ピリドキサール 5'-リン酸	PLP
	-CH ₂ NH ₂	-H	ピリドキサミン	PM
		-PO ₄ H ₂	ピリドキサミン 5'-リン酸	PMP

を図-1 に示す。これらの化合物に共通して含まれるのは 2-メチル-3-ヒドロキシ 5-ヒドロキシメチルピリジン骨格であり、通常この構造を有する化合物をピリドキシル化合物と呼ぶ。図中の PN-5' -β-Glc は植物性食品中に見出される化合物である。また、PIC は哺乳動物の尿中排泄物であり、B₆ としての効力はない。

水に対しては一般的に可溶で、薄い黄色を呈する。酸性条件下では安定であるが、アルカリ性条件下では、光、特に紫外線に対して不安定で 6-位に OH 基が導入されると生物活性がなくなる³⁾。

3. 腸管吸収・体内輸送機構²⁻⁵⁾

B₆ の吸収は低濃度の場合、メディエーターを介する仲介拡散によると報告されてい

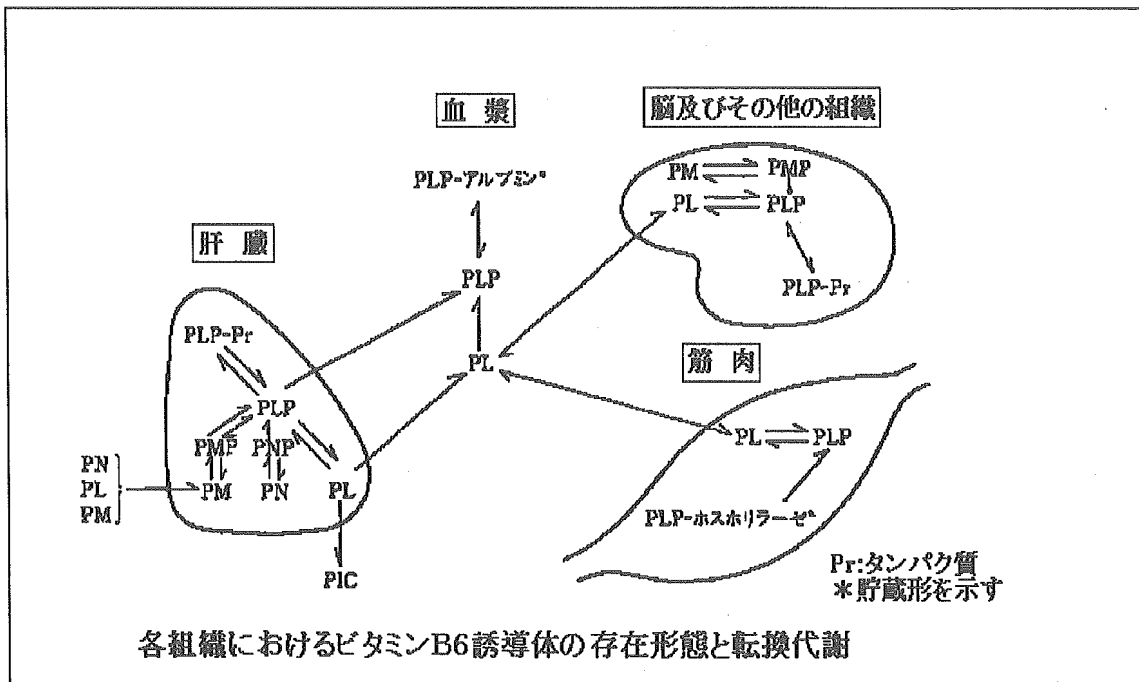
るが、大量の場合は単純拡散によって門脈に集められる。主な代謝サイトは肝臓で活性型に転換され、血液を介して末梢組織へ運搬される。PN, PL, PM の 3 化合物は、腸管からの吸収に際して同等であるが、リン酸エステル形の PNP, PLP, PMP は消化管膜を通過できないので加水分解を受け、遊

離型となって細胞膜を透過し、細胞内で再びリン酸エステルとなってアルブミンなどのタンパク質と複合体を形成し、各器官へ運搬されると考えられている。肝臓をはじめ多くの器官には B₆ 化合物の相互転換をつかさどる酵素系が備わっており、それぞれの臓器で活性型である PLP に変換される。その大略を図-2 に示した。

4. 補酵素への生合成経路^{2,4-7)}

ヒトを含む哺乳動物での補酵素の生合成の経路は、図-3 に掲げた通りである。植物性食品からは主として PN 及び PL が、動物や微生物食品からは PL と PM が供給される。それらのリン酸エステル型 (PNP, PLP, PMP) は消化管で一旦脱リン酸され、遊離の形になる。これらは PL キナーゼ [EC

図 2.



2. 7. 1. 35]によって ATP のリン酸が転移し、PNP, PLP, PMP となる。PLP はそのまま補酵素としてアポタンパク質に取り込まれるが、PMP と PNP はピリドキシン 5'-リン酸 (PNP)/ピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) 酸化酵素 [EC 1. 4. 3. 5] によって PLP に転換される。肝臓には強い活性が認められる。ついで腎臓、脳に中等度の活性が認められるが、筋肉中には存在しない。なお、赤血球中にはわずかな活性が認められるのみである⁷⁾。

5. 異化代謝経路

ヒトの血漿及び尿中には PIC が認められるが、多量の B₆ を摂取した後などでは、P と共に PL も認められる。通常、B₆ 化合物が尿中に排泄されるためには、肝臓でアルデヒドオキシダーゼ [EC 1. 2. 3. 1] によって PL → PIC の反応が起こり、PIC として排泄される。植物性食品中に認められる PN-5'-β-Glc はそのままの形では生理活

性型には変換されない⁸⁾。小腸粘膜刷子縁に存在する Lactase/Phlorizin Hydrolase (LPH)⁹⁾ [EC 3. 2. 1. 23; 3. 2. 1. 62; 3. 2. 1. 108]あるいは、肝臓¹⁰⁾に存在するβ-グルコシダーゼ [EC 3. 2. 1. 21] によって PN となったものは生理活性型として利用される。

6. 補酵素作用¹¹⁾

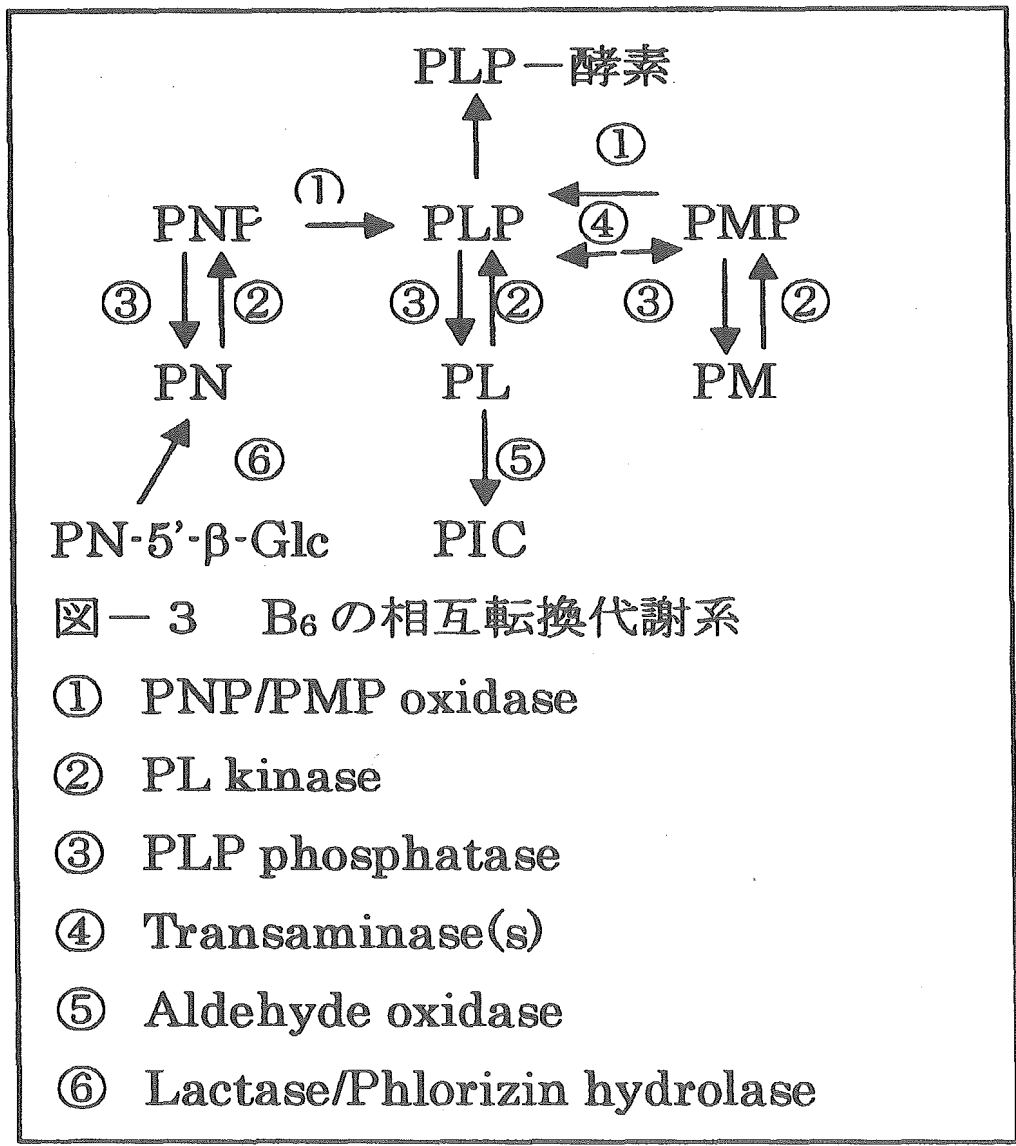


図 3. B₆ の相互転換代謝系

現在までに、ヒトを含む高等動物において認められている B₆ 依存性酵素を表-1 に示す。30 種類程度の酵素が B₆ 依存性の酵素として同定されているが、ホスホリラーゼ [EC 2.4.1.1] の例外を除いて、アポタンパク質との結合には PLP の 4-位のホルミル基(-CHO)によるリジン残基とのシッフ塩基の形成が関与している。しかし、酵素が触

PLP は反応性に富むホルミル基を有するため遊離で存在した場合、各種のタンパク質のリジン残基と相互作用し、生理作用を営むことが確認されている。レセプタータンパク質と相互作用することによりステロイドホルモンの作用を和らげる効果も指摘されている¹²⁾。

例えば、DNA polymerase II の作用を拮

表-1 高等動物に認められた B₆ 依存性酵素

[EC] 番号	名称	所在
2.1.2.1.	Serine hydroxymethyltransferase	ウサギ肝 Mit, Cytosol
2.3.1.37.	δ-Aminolevulinate synthase	動物の肝臓, 造血組織, その他の組織
2.3.1.50.	Serine palmitoultransferase	脳を含む動物臓器の Mic
2.4.1.1.	Phosphorylase	骨格筋と肝をはじめとする種々の動物臓器
2.6.1.1.	Aspartate aminotransferase	動物細胞に広く分布(各種アイソザイム有り)
2.6.1.2.	Alanine aminotransferase	動物細胞に広く分布(各種アイソザイム有り)
2.6.1.4.	Glycine aminotransferase	ラット, ヒトの肝臓, 脳
2.6.1.5.	Tyrosine aminotransferase	動物組織に広く存在
2.6.1.7.	Kynurenine aminotransferase	動物の肝臓, 腎臓
2.6.1.13.	Ornithine 5-aminotransferase	ラット肝臓, 腎臓, 小腸
2.6.1.19.	Aminobutylate aminotransferase	動物の脳, 肝臓, 腎臓
2.6.1.31.	Pyridoxamine oxaloacetate transaminase	ウサギ肝臓
2.6.1.42.	Branched-chain-amino acid aminotransferase	各種動物の筋肉
2.6.1.43.	Aminolevulinate aminotransferase	牛肝臓 Mit
2.6.1.44.	Alanine glyoxylate aminotransferase	動物肝
2.6.1.49.	Dihydroxyphenylalanine aminotransferase	動物肝, 脳 Mit
2.6.1.51.	Serine-pyruvate aminotransferase	動物肝実質細胞 Mit, 腎
2.6.1.57.	Aromatic-amino acid aminotransferase	動物の脳
3.7.1.3.	Kynureninase	動物肝臓, 腎臓
4.1.1.15.	Glutamate decarboxylase	動物の脳, 肝臓, 心臓
4.1.1.17.	Ornithine decarboxylase	ラット肝, 前立腺
4.1.1.22.	Histidine decarboxylase	腹腔内の遊離肥満細胞腫, 胃
4.1.1.28.	Aromatic L-amino acid decarboxylase	各種動物臓器
4.1.1.29.	Cysteinesulfinate decarboxylase	動物組織(肝)
4.2.1.13.	L-Serine dehydratase	ヒツジ肝, ラット肝
4.2.1.22.	Cystathionine β-synthase	哺乳動物の種々の組織
4.2.3.2.	Ethanolamine-phosphate phospho-lyase	ラット, ウサギの肝臓
4.4.1.1.	Cystathionine γ-lyase	動物の肝臓

媒する反応は、アミノ基の転位(置換)反応、α,β-脱離反応、α,γ-脱離反応、脱炭酸(α-脱離)反応など多岐にわたっている。

7. 補酵素作用以外の作用^{12), 13)}

抗的に阻害し、遺伝子の発現調節やホルモン作用の調節¹³⁾などに関与している。また、PM, PN は¹O₂の消去作用が強く、生体における活性酸素の消去剤として機能している