

可能性が指摘¹⁴⁾されている。

8. 欠乏症^{2,4,5)}

B₆の欠乏症としては古くから、脂漏性皮膚炎や貧血(小赤血球性貧血)が有名である。脂漏性皮膚炎は、いわゆる必須脂肪酸欠乏の際にも観察される症状であり、その成因が注目されていたが、Sheらの研究¹⁵⁻¹⁸⁾でB₆欠乏が必須脂肪酸から誘導される多価不飽和脂肪酸の生合成を障害することが原因であると証明された。また、小赤血球性貧血は血色素のポルフィリン核生合成の初発酵素である δ -aminolevulinate synthase [EC 2.3.1.37]がB₆依存性酵素であり、欠乏するとポルフィリン核が合成できないため血色素が不足する。また、必須アミノ酸であるトリプトファンとメチオニンの代謝では図-4に示したようにB₆依存性酵素が関与しており、欠乏すると代謝異常をきたし、トリプトファンからはキサントレン酸、メチオニンからはホモシステインという異常代謝産物が尿中に多量に排泄されたり、血液中に蓄積する。そして、顕著な免疫系の変性¹⁹⁾が起きる。胸腺の萎縮²⁰⁾とリンパ球の構造変性及び細胞内含量の減少が記録¹⁹⁾されている。また、最近では、B₆欠乏で脳波(EEG)異常がおきることが報告²¹⁾されている。

9. 薬理作用

これまでの報告で、B₆に特別な薬理作用があるとは記載されていない。妊婦の悪阻や乗り物酔いにB₆が有効であるとわれてきた。

10. 毒性

多量にかつ長期間PN・HClを摂取し続けた結果、末梢性感覚性神経症(peripheral sensory neuropathy)になったとの報告²²⁾がある。また、長期間の連用により蓚酸腎臓結石発生の危険性が示唆されている²²⁾。これらの報告に基づいてNOAELは200 mg程度と推定されている。

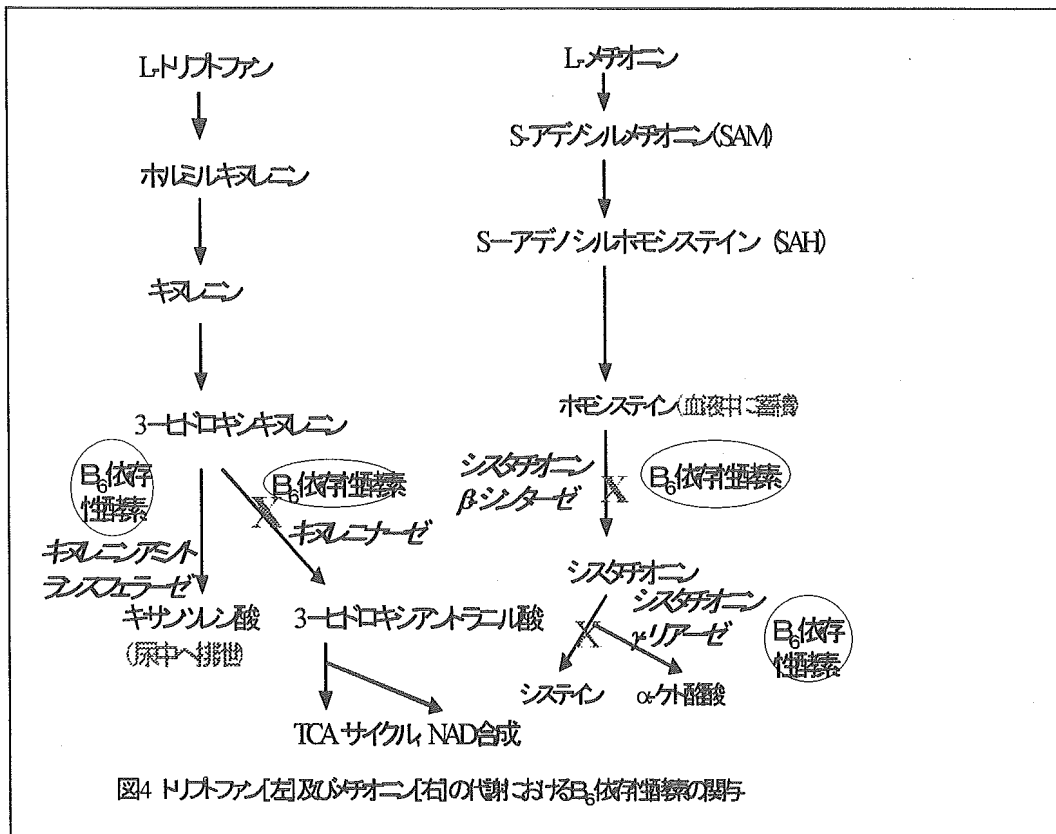


図4 トリプトファン(左)及びメチオニン(右)の代謝におけるB₆依存性酵素の関与

II. 測定法^{3, 23-31)}

1. 血清 B₆ 含量の測定

ヒト血清中の総 B₆ 量を測定するためには HPLC 法が有用である。例えば、逆相系のカラムを用いて、蛍光検出器を備えた HPLC²⁸⁾ が使われているが、血清中には強い盲蛍光物質が存在し、定量を困難にしている。特に PLP は、他の化合物とは蛍光特性が異なるため、総 B₆ 量を一度に測定することは困難である。最近、sodium bisulfite を用いたポストカラム法²⁹⁻³¹⁾ で全 B₆ 化合物を同等の感度で測定できる方法が提案されているが、まだデータ数が少なく、特に B₆ のサプリメントを摂っていない健康人の血清中の濃度を満足な感度で測定できるか否かは不明である。

以前には、血清中の PLP 濃度を定量する目的で酵素法³²⁾ も採用されていた。

るが、摂取している B₆ の量に大きく左右される。尿中に見出される PIC の定量には、血清中の定量法とは異なる HPLC 法³⁴⁾ が使われる。これは PIC のみを定量することを目的としている。

3. 食品中の総 B₆ 量の測定法^{3, 35)}

五訂「日本食品標準成分表」³⁶⁾ で B₆ の定量法として採用された方法は *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 を用いた微生物定量法³⁵⁾ である。この方法は、全 B₆ 化合物を一括して定量するのに便利であるが、*S. cerevisiae* 菌はリン酸エステル型を含めた、いわゆる結合型誘導体を利用できないため、定量に先立ち試料を加水分解し、遊離型に変換するための前処理操作が必要である。動物性食品と植物性食品とでは加水分解の条件を変える必要がある³⁷⁾、しかも定量操作が煩雑で、信頼のおけ

表-2 日本人のビタミン B₆ 摂取量の現状 (mg/日)

	年齢	全体	1-6	7-14	15-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70 以上
全体	摂取量	1.18	0.73	1.13	1.18	1.08	1.12	1.19	1.34	1.38	1.17
	平均所 要量	1.31	0.59	1.02	1.41	1.41	1.41	1.31	1.44	1.39	1.37
	摂取量	1.28	0.76	1.19	1.29	1.18	1.27	1.31	1.44	1.50	1.25
男性	平均所 要量	1.49	0.61	1.14	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60
	摂取量	1.09	0.70	1.06	1.07	0.99	0.99	1.08	1.25	1.27	1.12
	平均所 要量	1.15	0.58	0.89	1.20	1.24	1.25	1.20	1.20	1.20	1.20

2. 尿中の B₆ 含有量の測定

尿中に見出される B₆ 化合物の 50% 以上が PIC である³³⁾。その他、PL や PN も検出され

る定量値を得るまでに熟練を要する等の欠点がある。

III. 摂取量

1. 日本人の平均摂取量³⁸⁾

平成13年の国民栄養調査の概要³⁸⁾によると日本人全体の平均摂取量は1.18 mg/日であり、所要量(1.31 mg/日)を満たしていない唯一のビタミンである。特に成人の摂取量は男女共、表-2に示したように、殆どの年齢層で基準値を満たしていない。

2. 食品群別摂取量³⁸⁾

国民栄養調査の結果からも、日本人のB₆給源は、動物性食品と植物性食品がほぼ1:1の割合であると推定されるが、詳しい調

るLPH⁹⁾によって分解されない限り、B₆としての活性を示さない可能性が高く、今後の詳細の研究が必要である。

3. 調理・加工処理における損失

加熱による食品加工処理によってかなりのB₆化合物が分解されたり、他の化合物に変化する。特に、ホルミル基を有するPLP及びPLは食品タンパク質中のリジン残基と反応し、ε-ピリドキシルリジンに変化する。この化合物はB₆欠乏状態の動物にはB₆の拮抗作用物質として働く³⁹⁾。

IV. 必要量と過剰⁴⁰⁾

1. EARを評価するための指標とEARに関する基礎的実験

成人のためのEARを導き出すために基礎となるような単一の指標はない。通常用いられている指標は①血清中PLP濃度、②尿中PIC排泄量、③血清中に存在するアスパラギン酸アミノトランスアミナーゼ(AST)及びアラニントランスアミナーゼ(ALT)活性の補酵素(PLP)添加時の活性化率及び④トリプトファン負荷時の尿中キサンツレン酸排泄量などを総合的に評価することにより単独の指標で陥る過ちを避けるよう工夫している。

B₆の必要量を左右する最も重要な因子はタンパク質の摂取量である。Leklemら⁴¹⁾は、血漿PLP濃度とタンパク質摂取量(g)に対するB₆摂取量(mg)との間には強い相関性($\gamma=0.928$)があることを指摘している。すなわち、タンパク質摂取量が増加するとB₆必要量が増加することを示している。血漿PLP濃度を30 pmol/ml以上に保つのに必

表-3 B₆栄養状態の指標とその基準値

項目	健康人の基準値
[直接法]	
血清中 PLP 濃度	>30 pmol/ml
総血中 PLP 濃度	
血清中総 B ₆ 量	>40 pmol/ml
尿中 PIC 排泄量	>3.0 μ mol/日
尿中総 B ₆ 排泄量	>0.5 mmol/日
[間接法]	
赤血球中 AST-活性化率	<1.80
赤血球中 ALT-活性化率	<1.25
尿中キサンツレン酸排泄量	>65 μ mol/日
血清中ホモシステイン濃度	
脳波(EEG)異常	

査はなされていないのが現状である。最近の研究から、植物性食品中に存在するPN-5' - β -Glc は小腸粘膜刷子縁に存在す

要なB₆摂取量として、0.014 mg/g (タンパク質)を設定している。

2. 過剰症²²⁾

健常者において食物及びサプリメントからの過剰なB₆摂取に伴う悪影響としては、長期間(2~40カ月)にわたり、ピリドキシンを2,000~4,000mg/日服用した人で末梢性感覚性神経症になったとの報告、長期間の300~500mg/日の服用で知覚神経障害が起こったとの報告がある。

V. 健常人の濃度

1. 血液

1-1. 成人の血清 PLP 濃度

今回の研究において所要量(男性:1.6 mg/日, 女性:1.2 mg/日)摂取時の若い男性・女性(各10人)の血清 PLP 濃度は、男性で103.0 pmol/ml (25 ng/ml)であり、女性で155.1 pmol/ml (38 ng/ml)であった。女性の血清中 PLP 濃度が高値を示しているが、性差による違いなのか、その他の要因によるかは現時点では不明である。いずれにしても、基準値30 pmol/mlを充分超えている数値であった。これらの値は、以前にHiroseら⁴²⁾が、健常な成人男女7人について分析した血清中 PLP 濃度(17.06±6.31ng/ml)よりもかなり高い値であった。

1-2. 男女差

今回の研究で血清 PLP 濃度に性差がみられたが、この原因は不明である。

2. 尿への排泄

体内を循環しているB₆は、常に一定量が

PICとして排泄されている。この値の基準値は通常、3.0 μmol/日以上⁴¹⁾であり、この値以下の場合欠乏状態であると判定される。今回の研究では、男性2.79 μmol/日、女性3.32 μmol/日という値からすると男性で若干低い値である。また、摂取B₆量に対するPIC排泄量の割合は、男性33%、女性45%であった。

3. 糞便中への排泄

抗生物質を連用している患者でB₆不足と思われる皮膚炎や口内炎が観察されることから、大腸中に生息する腸内細菌が、かなりの量のB₆を合成し、ヒトはある部分を吸収利用しているのではないかと推定されている。また、一部は糞便中に排泄されていると予測されるが、詳しく調べられたデータはない。

4. 指標となる他の生体成分の量

4-1. 尿中キサントレン酸排泄量

トリプトファン代謝(図-4参照)の主経路は、B₆依存性酵素であるキヌレニナーゼという酵素の触媒で進行する。副経路であるキサントレン酸経路にもB₆依存性の酵素が関与しているが、B₆欠乏条件下では、この副経路が主経路として使われ、異常な代謝産物、キサントレン酸の尿中排泄へと導く。Driskell⁴³⁾は、2gのトリプトファンを経口的に摂取させて、24時間尿中のキサントレン酸の排泄量が、65 μmol以下であれば、B₆の栄養状態は正常であると示唆している。

4-2. 血清中ホモシステイン量

ホモシステインは硫黄転移経路(図-4参

照)を経てシステインに代謝される。この経路には B₆ 依存性酵素が 2 ヶ所で関与している。ホモシステインはまた葉酸とビタミン B₁₂ 依存性酵素によってメチオニンへの再メチル化反応にも使われる。そのため、完全な B₆ 依存性とはいえないが、栄養状態の変化によって血漿中ホモシステイン濃度は影響を受ける。しかし、ERA を設定するための指標とするためには研究例が少なく適当ではない。

4-3. 血清中 AST 及び ALT の活性化率

赤血球中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) の PLP による活性化率及び同アラニントランスアミナーゼ (ALT) の PLP による活性化率は長期間の B₆ 栄養状態を評価するために広く使われてきた。これらの指標は、アポ酵素型の酵素量の増加割合を示すもので、AST の場合 1.80 以下、ALT の場合 1.25 以下の場合、B₆ の栄養状態が十分であるという証拠になると示唆されてきたが、明瞭な限界値を示すことは出来ない。

VI. 適正量を摂取するには

1. 多く含む食品

表-4 に 5 訂「日本食品標準成分表」³⁶⁾ に収載されている食品中の B₆ 含量の高い食品を示した。しかし、植物性食品⁴⁴⁾ 中には PN-5' -β-Glc を含むものが多く、注意が必要である。

2. 生体利用率

B₆ の生体利用率は最近 Gregory⁴⁵⁾ によってレビューされている。混合食中の B₆ は大体 75% の生体利用率である。日本人の日常食している食品中の PN-5' -β-Glc の含量

は不明であるが、この化合物の生体利用率は他の B₆ 化合物と比較し、大体 50% の生体利用率であると見積もられている。

3. 利用を阻害する化合物²⁾

以前から抗結核薬、イソニコチン酸ヒド

表-4 B₆ を多く含む食品(B₆ mg/100 g)

食品名	含量
にんにく (りん茎)	1.68
ピスタチオ (いり味付け)	1.22
ひまわりの種 (いり味付け)	1.18
みなみぐる (赤身)	1.08
にわとりむね (皮なし、若鶏)	1.06
みなみぐる (脂身)	1.00
あまのり (丸のり)	0.94
うし肝臓	0.89
かつお (生)	0.87
きはだまぐる (生)	0.87
ほんまぐる (赤身)	0.85
ほんまぐる (脂身)	0.82
うるめいわし丸干し	0.69
テラピア (生)	0.67
にわとり肝臓	0.65
しろざけ (生)	0.64
ひよこまめ (前龍、乾)	0.63

ラジッドなどが B₆ の生体内での利用度を阻害する物質として知られている。これは、いわゆるカルボニル試薬と呼ばれるもので、PLP のホルミル基と反応し、補酵素として利用出来なくする化合物である。この化合物のグループにはまた、シクロセリン、ペニシラミン、ドーパミンなどの薬剤が含まれる。また、デオキシピリドキシンなどのような構造類似のアンチビタミンも B₆ の利用度を低下させる薬剤である。

引用文献

1. 島薨順雄, 方木庄次郎: ビタミン-研究

- 史を中心として[II], p. 212-234, 共立出版, 1980.
2. 左右田健次, 八木年晴: ビタミンの事典, p. 201-227, 朝倉書店, 1996.
 3. Eitenmiller RR & Landen WO: Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences, p. 369-409, CRC Press, 1999.
 4. Friedrich W: Vitamins, p. 543-618, Walter de Gruyter, 1988.
 5. Leklem JE: Handbook of Vitamins; (2nd Ed) p. 341-392, Marcel Dekker, 1991.
 6. McCormick DB & Merrill AH: Vitamin B₆ Metabolism and Role in Growth ed by Tryfiates GP, p. 1-26, 1980.
 7. Fonda ML: Comp. Biochem. Physiol. 90B, 731-737, 1988.
 8. 柘植治人: ビタミン, 77, 102-105, 2003.
 9. Armada LJ, et al: J. Nutr. 132, 2695-2699, 2002.
 10. Wang HR & Trumbo PR: Nutr. Res. 16, 1613-1618, 1996.
 11. Martell AE: Advance in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 53, 163-199, 1982.
 12. Tully DB, et al: FASEB J. 8, 343-349, 1994.
 13. 名取靖郎: ビタミン, 73, 481-484, 1999.
 14. Ehrenshaft M, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 9374-9378, 1999.
 15. She Q-B, et al: Biosci. Biotechnol. Biochem. 58, 459-463, 1994.
 16. She Q-B, et al: Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 163-167, 1995.
 17. 余青柏, 他: ビタミン, 70, 423-434, 1996.
 18. 柘植治人: FFIJ ジャーナル, (177), 49-56, 1998.
 19. Ha C, et al: Cell Immunol. 85, 318-329, 1984.
 20. 柘植治人: ビタミン, 77, 145-160, 2003.
 21. Kretsch MJ, et al: Am. J. Clin. Nutr. 53, 1266-1274, 1991.
 22. 第六次改定「日本人の栄養所要量」 p. 103, 第一出版, 1999.
 23. Ubbink JB: Modern Chromatographic Analysis of Vitamins (3rd Ed) p. 435-477, Marcel Dekker, 2000.
 24. 柘植治人, 広瀬尚孝: ビタミン, 63, 349-360, 1989.
 25. Tsuge H, et al: Agric. Biol. Chem. 50, 195-197, 1986.
 26. Tsuge H, et al: Agric. Biol. Chem. 52, 1083-1086, 1988.
 27. Hirose N, et al: J. Nutr. Sci. Vitaminol. 36, 521-529, 1990.
 28. Tsuge H: Method in Enzymol. 280, 1-12, 1997.
 29. Edwards P, et al: Clin. Chem. 35, 241-245, 1989,
 30. Kimura M, et al: J. Chromatogr. 722, 295-301, 1996.
 31. Bisp MR, et al: Anal. Biochem. 305, 82-89, 2002.
 32. Haskell BE & Snell EE: Anal. Biochem.

- 45, 567-576, 1972.
33. Lui A, et al: J. Lab. Clin. Med. 106, 491-497, 1985.
34. Gregory JF & Kirk JR: Am. J. Clin. Nutr. 32, 879-883, 1979.
35. AOAC International, Official Methods of Analysis, 16th ed., AOAC International, Arlington, VA, 1995.
36. 五訂「日本食品標準成分表」大蔵省印刷局, 2000.
37. 柘植治人, 他: ビタミン, 69, 689-696, 1995.
38. 平成 13 年度国民栄養著査結果の概要: 栄養日本, 46, 114-131, 2003.
39. Grun IU, et al: J. Agric. Food Chem. 39, 102-108, 1991.
40. DRI for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic acid, Biotin and Choline: p. 150-195, National Academy Press, Washington, DC, 1998.
41. Leklem JE: J. Nutr. 120, 1503-1507, 1990.
42. Hirose N, et al: J. Nutr. Sci. Vitaminol. 36, 521-529, 1990.
43. Driskell JA: Nutr. Res. 14, 293-324, 1994.
44. Kabir H, et al: J. Food Sci. 48, 1422-1425, 1983.
45. Gregory JF: Eur. J. Clin. Nutr. 51, S43-S48, 1997.

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 B₁₂—

研究協力者 渡辺文雄 高知女子大学生生活科学部教授

宮本恵美 高知女子大学生生活科学部助手

研究要旨

第六次改定食事摂取基準に基づき、被験者（男女各 10 名）に 2.4 μg (1.8 nmol) /day のビタミン B₁₂ (B₁₂) を与えた。血清中の B₁₂ 濃度はケミルミアナライザー ACS-180 で、尿中の B₁₂ 濃度はバイオアッセイ法 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830) で定量した。血清 B₁₂ 濃度は、男性で 447 pg/mL (323 pmol/L)、女性で 900 pg/mL (664 pmol/L) となった。尿中 B₁₂ 濃度は男性で 101 ng (74 pmol)/day [5.3 nmol/mol creatinine]、女性で 204 ng (150 pmol)/day [15.4 nmol/mol creatinine] となり、血清 B₁₂ 濃度と尿中 B₁₂ 濃度に相関がみとめられた。血清 B₁₂ 濃度及び尿中 B₁₂ 濃度は、これまでに健常者で報告されている値と同程度であった。B₁₂ 摂取量に対する尿中 B₁₂ 排泄量の割合は男性 4.2%、女性 8.5% となり、血清 B₁₂ 濃度に性差がみられることは報告されているが、尿中 B₁₂ 排泄量にも性差が観察された。また、男女とも尿中 B₁₂ 排泄量に有意な日内変動は観察されなかった。これまで報告されている体内 B₁₂ プール量、胆汁中の B₁₂ 量とその形態、腸管から吸収率、尿中排泄量などのデータから推定される所要量摂取時の B₁₂ の出納は若干負になるため、2.4 μg /日の摂取量は欠乏症を防ぐためには十分な量であるが、疾病のリスクリダクションの効果や平均的な体内 B₁₂ プール量の維持には不十分であるかもしれない。

1. 基礎

1. 発見¹⁾

ビタミン B₁₂ (B₁₂) は抗悪性貧血因子として肝臓中に発見された。1926年に Minot と Murphy はヒトの悪性貧血の肝臓療法を確立し、1948年に Folkers らや Smith らはこの因子を赤色結晶状に単離することに成功した。その後、B₁₂ は微生物の発酵により大量に生産されるようになり、その化学構造や性質が明らかとなった。さらに、1958年に Barker らが嫌気性細菌のグルタミン酸異性化反応に光に不安定な補酵素型 B₁₂ が関与することを発見した。その後、アデノシル B₁₂ (AdoB₁₂) とメチル B₁₂ (MeB₁₂) を補酵素する酵素が次々と発見された。現在までに B₁₂ 依存性酵素や B₁₂ 結合タンパク質およびその受容体の遺伝子がクローン化され、一次構造が明らかとなっている。

2. 名称と性質¹⁾

B₁₂ および関連化合物の構造の名称を図-1 に示す。これら化合物に共通して含まれるテトラピロール様骨格はコリン環と呼ばれ、コリン環を含む化合物はコリノイドと総称される。塩基に 5,6-ジメチルベンズイミダゾールを含むコバミドは B₁₂ 類またはコバラミンと呼ばれる。

通常、B₁₂ は上方配位子 (L) にシアノ基を配位したシアノ B₁₂ (CN-B₁₂) をさすが、これは生体から B₁₂ 類を効率よく抽出するときに生成する人工産物である。B₁₂ は生体内に取込まれ活性型(補酵素型)の AdoB₁₂ と MeB₁₂ に変換され機能する。これら B₁₂ 補酵素

はいずれも光に非常に不安定である。

コリノイドは赤、黄、紫、褐色、緑など美しい色を呈し、紫外および可視部の特徴ある吸収スペクトル(長波長側から α および β 帯(420-660nm 付近)と γ 帯(350-370nm 付近))は、それら化合物の同定に用いられる。

CN-B₁₂ は針状またはプリズム状結晶であり、固体状態では安定である。溶液では pH 4-6 で最も安定で、遮光下、室温で数年間保存できる。オートクレーブ殺菌も可能であり、強酸性、強アルカリ性では徐々に分解する。

3. 腸管吸収・体内輸送機構

B₁₂ の吸収と輸送には内因子(intrinsic factor, IF), トランスコバラミン II (transcobalamin II, TCII), ハプトコリン(Haptocorrins, HC, あるいは R-binder)などの B₁₂ 結合タンパク質とそれらの受容体が関与している(図-2)。²⁾ 食物中の B₁₂ は多くの場合 AdoB₁₂ や OH-B₁₂ であるが、タンパク質と結合しており胃酸や消化酵素の作用で遊離する。遊離した B₁₂ は唾液腺由来の HC に結合し、ついで十二指腸において HC が膵液中のタンパク質分解酵素(トリプシンなど)によって部分的に消化される。その後、胃の壁細胞から分泌された IF に移行する。IF-B₁₂ 複合体は腸管を下降していき、中性 pH 域においてカルシウム存在下で主として回腸下部の刷子縁膜微絨毛に分布する IF-B₁₂ 複合体受容体に結合し、エンドサイトシスにより腸管上皮細胞に取込まれ

る。その後、リゾゾームで遊離した B_{12} は腸上皮細胞内で生産された TCII と結合し門脈血中に出現する。最近、IF- B_{12} 複合体受容体がキュビリン(Cubilin)と呼ばれるタンパク質と同一であることが報告された。³⁾

血液中の TCII- B_{12} 複合体の標的細胞への取込は TCII- B_{12} 複合体受容体を介したエンドサイトシスにより生じる。 B_{12} 複合体と受容体との結合には中性 pH 域においてカルシウム存在が不可欠である。最近、上述した TCII- B_{12} 複合体受容体以外にもメガリン(Megalyn)と呼ばれる受容体が存在することが報告されている。⁴⁾

一方、血液中にも HC が存在し、アシアログリコタンパク質受容体を介して肝臓の細胞に取込まれるが、その詳細な生理機能についてはわかっていない。

4. 補酵素への生合成経路

ヒトを含む哺乳動物での B_{12} 補酵素の生合成経路の詳細はよくわかっていない。微生物における研究から以下のような生合成経路が推定されている(図-3)。⁵⁾ まず、細胞内に取り込まれた OH- B_{12} (B_{12a}) は、アクアコバラミンレダクターゼ(EC 1.6.99.8)の作用でコリン環の3価のコバルトが1電子還元され、コブ(II)アラミン(B_{12r})となる。コブ(II)アラミンはコブ(II)アラミンレダクターゼ(EC 1.6.99.9)の作用でさらに1電子還元されコブ(I)アラミン(B_{12s})となる。その後、コブ(I)アラミンアデノシルトランスフェラーゼ(EC 2.5.1.17)の作用でAdo B_{12} を生成する。ヒトの肝臓などにNADPHとNADHに共

役したアクアコバラミンレダクターゼ活性の存在が報告され、⁶⁾ また、 B_{12} 代謝異常症の患者より分離した皮膚線維芽細胞においても本酵素活性がミトコンドリアとミクロソームに存在することが報告されている。⁷⁾ しかし、ヒトにおいてその他の補酵素合成系に関与する酵素の存在の報告はない。

Me B_{12} は、OH- B_{12} と結合したメチオニン合成酵素タンパク質上でメチオニン合成酵素レダクターゼとSAMによりMe B_{12} と合成される。⁸⁾ ヒトにおいてその他Me B_{12} 合成系の存在は報告されていない。

5. 異化代謝経路

ヒトの血清や各組織あるいは胆汁中にはコピナミド(コリン環コバルトと配位したヌクレオチドの存在しない)様 B_{12} アナログがかなり存在することが報告されている。

⁹⁾ この様な B_{12} アナログは食品中に含まれていたとしても腸管吸収に関与するIFと結合することができなために腸管から吸収されない。このことは、生体内で B_{12} から生成すると考えられるが、どのようなメカニズムで B_{12} アナログが生成されるのか不明である。

6. 補酵素作用¹⁰⁾

現在までに、ヒトを含む高等動物において2種類の B_{12} 依存性酵素が知られている(図-4)。生体内で奇数鎖脂肪酸やアミノ酸(バリン、イソロイシン、スレオニン)の代謝に関与するAdo B_{12} 依存性メチルマロニルCoAムターゼ(EC 5.4.99.2)と、5-メチルテトラヒドロ葉酸(5- CH_3-H_4 -葉酸)とホモシステインからメチオニンの合成に関与す

る MeB₁₂ 依存性メチオニンシンターゼ (EC2.1.1.13) である。

また、ロイシンの異化に関与する AdoB₁₂ 依存性ロイシン 2,3-アミノムターゼの存在も報告されているが、未だ確証は得られていない。その他数種の AdoB₁₂ および MeB₁₂ 依存性酵素が細菌や原生動物において見出されている。

7. 補酵素作用以外の作用

補酵素作用以外の生理作用の確証は得られていない。

8. 欠乏症はどのようにして起こるのか

B₁₂ 欠乏などによりメチルマロニル CoA ムターゼ活性が低下すると、生体内にメチルマロン酸 (MMA) が蓄積し、尿中に MMA が排泄される。この MMA 排泄量の増加はヒトを含む高等動物の B₁₂ 欠乏状態の指標として広く用いられている。また、動物実験において生体内の MMA 蓄積が TCA サイクルに関与するコハク酸脱水素酵素の活性を顕著に阻害することでエネルギー生産を低下させることが B₁₂ 欠乏による種々の代謝障害や生長遅延の一因であると考えられている。

11)

メチオニンシンターゼはメチオニン代謝と葉酸代謝の接点に関与し、B₁₂ 欠乏によるメチオニンシンターゼ活性の低下はメチオニン生成の低下だけでなく、葉酸代謝にも著しく影響を与える。B₁₂ 欠乏における巨赤芽球出現の機構として葉酸代謝と共役した DNA 合成異常によるとする「5-CH₃-H₄-葉酸トラップ説」が提唱されている。¹²⁾

9. 薬理作用

B₁₂ の補酵素作用以外の作用として OH-B₁₂ は容易に CN アニオンと結合し CN-B₁₂ を生じる性質があるため、食品中やタバコの煙などから生体に取り込まれる微量な CN アニオンのスクャベンジャーとなりうることから、CN 中毒の解毒剤としての利用も検討されている。¹³⁾ また、近年生理活性物質として注目されている一酸化窒素のスクャベンジャーとしての作用も報告されている。¹⁴⁾

MeB₁₂ は睡眠・覚醒リズム障害¹⁵⁾ や男性不妊症の治療効果¹⁶⁾ が報告されている。

10. 毒性

毒性について確証のある報告はない。

11. 測定方法

1. 血清 B₁₂ 含有量の測定

定法により調製した血清 1.0 (or 0.5) mL をケミルミアナライザー ACS-180 で分析する。

2. 尿中の B₁₂ 含有量の測定

2-1. 尿からの B₁₂ の抽出法

尿 5.0 mL

(尿に沈殿物がある場合は、3000 x g 10 分間の遠心分離を行う。)

0.1M 酢酸緩衝液, pH 4.8: 1.0 mL

蒸留水: 3.8 mL

0.025 g/100 mL KCN 水溶液: 0.1 mL

よく混和し、オートクレーブで 120°C, 5 分間加熱抽出を行う。冷却後、10% (w/v) メタリン酸水溶液 (0.1 mL) を加える。3000 x g 10 分間遠心分離上澄画分を分離し、定量まで冷蔵庫内で保存する。全量 10 mL (2

倍希釈)を微生物学的定量法の分析試料としてテストチューブへ 0.1 ~1.0 mL 添加する。

2-2. 定量操作

2-2-1. B₁₂ 標準溶液

B₁₂ (シグマ社製) 標準結晶を 25% (v/v) エチルアルコールに溶解し, 1 μg/mL 溶液として冷蔵庫に保存する。使用前に 1 ng/mL に希釈する。

2-2-2. 培地

ライヒマニ保存用培地「ニッスイ」(日水製薬社製), ライヒマニ接種用培地「ニッスイ」, ライヒマニ用 B₁₂ 定量用基礎培地「ニッスイ」を用いる。

2-2-3. 接種菌液の調製

定量用菌株として *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を使用する。定量前日に保存培地(寒天培地)から接種用液体培地に接種し, 37°C で 20~24 時間培養する。これを 160 x g 5 分間遠心分離し, 遠心管底の菌体を静かに振とうし, 培地と同量の滅菌生理食塩水で菌体を 3 回洗浄する。分光光度計(波長 660 nm)で透過率(T%)が 70%になるように菌体を滅菌生理食塩水で希釈する。

2-2-4. 定量手順

定量用デイスポザブルポリプロピレン試験官(18 x 180 mm)に標準系列として, B₁₂ 標準液 10~100 μL, 定量用基礎培地 1.5 mL を加え, さらに総量が 3.0 mL となるように蒸留水 0~1.5 mL を加える。同様に被検液系列として B₁₂ 抽出液 0.1~0.5 mL, 定量用基礎培地 1.5 mL を加え, さらに総量が 3.0

mL となるように蒸留水 0.5~1.5 mL を加える。デイスポザブルポリプロピレンキャップ(滅菌栓)をした後, オートクレーブで 120°C, 3 分間滅菌し, 冷却後, 希釈菌体液を滅菌ピペットで 10 μL ずつクリーンベンチ内で接種する。37°C で 17~20 時間培養した後, 各試験官の菌の増殖度を分光光度計(波長 660 nm)で T% を測定し, 検量線より B₁₂ 抽出液中のビタミン B₁₂ 含有量を求め, それに希釈倍数をかけて単位試料あたりの B₁₂ 量を計算する。

III. 摂取量

1. 日本人の平均摂取量

女子大生では平均 3.5~4.8 μg/日,¹⁷⁾ 19) 高齢者の男性・女性とも 5.8 μg/日と報告されているが,²⁰⁾ 米国に比べ十分な調査報告がない。

2. 食品群別摂取量

女子大生では魚肉, 鳥肉, 卵, 牛乳, のりなどからの摂取が報告されているが,¹⁷⁾ 米国に比べ十分な調査報告がない。

3. 調理・加工処理における損失

焼く・ゆでる・揚げるなどの加熱調理による B₁₂ 残存率は牛肉各部位で 61~88%, 牛肉蔵肉で 54~98%, 豚肉各部位で 76~90%, 豚内蔵肉で 68~100%である。²¹⁾ その他, 牛乳中の B₁₂ は加熱調理により顕著に減少し, 電子レンジ 3 分加熱および直火 30 分の加熱で約 50%の B₁₂ が消失する。²²⁾ B₁₂ の加熱分解物が単離され, 実験動物に静脈内に投与されたが B₁₂ の代謝系を阻害する作用はなかった。²³⁾

4. 種々の食品の生物有効性と動態

報告された数種類の食品からの B₁₂ の吸収率は健康な成人（胃の機能が正常）において 50% と推定される。²⁴⁾

食事あたり 1.5~2.5 μg の B₁₂ で回腸レセプターは飽和するため、それ以上では吸収が著しく制限される。B₁₂ を豊富に含む食品を多量に食べた時、吸収率は減少する。

IV. 必要量と過剰

1. EAR を評価するための指標と EAR に関する基礎的実験

成人のための EAR を導き出すために基礎となるような単一の指標はない。一般的に次の 3 つの方法が考えられる。①適正な血清学的状態（正常なヘモグロビン値、正常な MCV、正常な網状赤血球反応）を維持するために必要な B₁₂ 量を決定する。②体内貯蔵を維持するのに必要な B₁₂ 量を評価する（B₁₂ 代謝量の使用）。③適正な血清 B₁₂ 値と MMA 値を維持するために必要な食事からの B₁₂ 摂取量を評価する。

米国の食事摂取基準では、十分に信頼できるデータが唯一存在する①番目の方法が EAR を導き出す方法に選ばれた。²⁴⁾

2. 過剰害²⁴⁾

健常者において食物およびサプリメントからの過剰な B₁₂ 摂取に伴う悪影響はない。悪性貧血患者に B₁₂ (1~5 mg) を定期的に非経口大量投与しても過剰害はない。1 mg の定期的な投与は悪性貧血患者を処置するための一般的な治療方法として使われている。また、大量に経口投与されても投与 B₁₂

量の数パーセントが腸管から吸収されるのみである。これらのことから B₁₂ が明らかに低毒性であることを示している。

V. 健常人の濃度

1. 血液

1-1. 成人の血清 B₁₂ 量

今回の研究において所要量 (2.4 μg/日) 摂取時の若い男性・女性 (各 10 名) の血清 B₁₂ 濃度は、男性で 447 pg/mL (323 pmol/L)、女性で 900 pg/mL (664 pmol/L) であり、十分にカットオフ値以上であり適正であった (図-5A, B, 図-6A, B)。この結果は、成人健常者で報告されている血清 B₁₂ 量 (322~1286 pg/mL) と同程度であった。¹⁷⁾

1-2. 男女差

今回の研究において血清 B₁₂ 濃度に性差が見られた。多数の若い男性・女性を対象とした研究においても血清 B₁₂ 値は男性で 647 pg/mL (477 pmol/L) 女性で 819 pg/mL (604 pmol/L) であった。²⁴⁾ 渡辺らも同様な結果 (男性: 684 pg/mL, 女性: 827 pg/mL) を報告している。¹⁷⁾ これらの研究データが性差による B₁₂ の要求性の相違とどのように関連しているのか検討する必要がある。

2. 尿への排泄

体内を循環している B₁₂ 量が血中の B₁₂ 結合容量を超えたとき、過剰分は尿中に排泄される。この典型的な例は、B₁₂ の非経口的な大量投与後にのみ生じる。

今回の研究では、尿中 B₁₂ 濃度は男性で

101 ng (74 pmol)/日 [5.3 nmol/mol creatinine], 女性で 204 ng (150 pmol)/日 [15.4 nmol/mol creatinine]となり (図-5C,D,E, 図-6C,D,E), 健常者で報告されている尿中 B₁₂濃度 (110~270 ng/日)と同程度であった。²⁵⁾ B₁₂ 摂取量 (2.4 μg/日)に対する尿中 B₁₂排泄量の割合は男性 4.2%, 女性 8.5%となり (図-5F, 図-6F), 血清 B₁₂濃度に性差がみられるのと同様に尿中 B₁₂排泄量にも性差が観察された。

また, 男女とも尿中 B₁₂排泄量に有意な日内変動は観察されなかった。

血清 B₁₂濃度と尿中 B₁₂濃度に相関がみとめられ (図-7), これまでの知見と一致する結果が得られた。²⁵⁾

3. 糞便中への排泄

通常 B₁₂は糞便へ最も多く排泄される。糞便中に排泄される B₁₂には吸収されなかった食物や胆汁中の B₁₂, 剥離細胞, 胃腸からの分泌物, 大腸で細菌により合成された B₁₂が含まれている。

ホールボディカウントの結果より体内 B₁₂貯蔵量にかかわらず 1日当たり B₁₂プールの 0.1~0.2 パーセントが代謝回転により消失する。²⁴⁾ ヒトの体内蓄積量を 2~3 mg とすると 1日当たり 2~6 μg となり, 尿中への排泄の割合は非常に小さい。

これまで報告されている体内 B₁₂プール量, 胆汁中の B₁₂量とその形態, 腸管から吸収率, 尿中排泄量などのデータから推定される所要量摂取時の B₁₂の出納を図-8に示す。その結果, 所要量摂取時において出

納は若干負になるため, 2.4 μg/日の摂取量は欠乏症を防ぐためには十分な量であるが, 疾病のリスクリダクションの効果や平均的な体内 B₁₂プール量の維持には不十分であるかもしれない。

4. 指標となる他の生体成分の量

4-1. 血液学的検査

平均赤血球容積 (MCV) は正確に測定できるが, 赤血球の長命が 120 日であるために B₁₂摂取に対するレスポンスに長時間を要するので, MCV の有効性は限定されている。また, 赤血球数, ヘモグロビン値, ヘマトクリット値も同様である。

4-2. 血清 B₁₂量

血清 (血漿) の B₁₂濃度は B₁₂摂取と貯蔵の両方を反映している。その最低限界は成人でおよそ 120 から 180 pmol/L (170 から 250 pg/mL)と考えられているが, 分析に用いる方法や機器により一定でない。欠乏症が進行するとき, 組織に貯蔵された B₁₂が血中に供給されることで血清 B₁₂値は一定に保たれると考えられる。そのため, カットオフ値以上の血清 B₁₂値が必ずしも適切な B₁₂状態を示しているとは限らない。

4-3. 血清 (血漿) メチルマロン酸 (MMA) 量

血清 MMA に関する基準値は 73 から 271 nmol/L である。²⁶⁾ B₁₂が不足するとき血清中の MMA 濃度は上昇する。血清 MMA 濃度は B₁₂欠乏症に非常に特異的であるので, B₁₂の栄養状態を示すよりよい指標となる。しかし, EARの基礎となるような B₁₂摂取と MMA

濃度の関係を直接に調べた研究がない。また、測定法の改良が顕著であるので古い研究からの血清 MMA 値は最近得られた MMA 値と比較できない可能性もある。

4-4. 血清（血漿）ホモシステイン量

葉酸あるいは B₆（あるいは両方）の不足もまた血清（血漿）ホモシステイン濃度を上昇させる。この指標は特異性が低く、EAR を策定するのに有効な指標とならない。

4-5. ホロトランスコバラミン II 量

3種の血漿 B₁₂ 結合タンパク質の中でトランスコバラミン II (TCII) は標的細胞へ受容体を介しての B₁₂ の取込みに関与している。しかし、血漿 B₁₂ の 10 から 20% のみが TCII-B₁₂ 複合体として存在しており、この画分をホロ TCII と呼び、B₁₂ のよい指標であることが最近認識されつつある。²⁷⁾ 最近、ホロ TCII 量の信頼できる測定法が開発されたが、²⁸⁾ 臨床応用されるにはまだかなりの時間を要する。

VI. 適正量を摂取するには

1. 多く含む食品²⁹⁾

牛肉、豚肉、鳥肉などの肉類（内臓肉を含む）特に、レバーは B₁₂ 含有量が高い。また、魚介類、藻類の一部（アオノリ・アマノリ）に多く含まれている。その他、鶏卵や牛乳にも含まれ、特に牛乳は B₁₂ 含有量はそれほど高くないが、摂取しやすさから重要な供給源の 1 つである。

2. 生物利用率の高い食品

特に生体利用率の高い食品は知られていないが、藻類に含まれる B₁₂ の生体利用率に

ついては古くから議論になっている。³⁰⁾ 栄養補助食品として流通しているスピルリナは豊富に B₁₂ を含むことが特徴であるが、ヒトにおいて生理的に不活性なシュード B₁₂ が主要なコリノイドであった。³¹⁾ 一方、クロレラ、アマノリ、アオノリは真の B₁₂ を豊富に含んでいた。^{32~34)}

また、高齢者の多くは胃酸分泌の低い萎縮性胃炎を有しているため、B₁₂ の生体利用率が減少している可能性がある。成人において食品からの B₁₂ の生体利用率は 50% と評価されているが、高齢者には適応できない。結晶 B₁₂ の生体利用率は萎縮性胃炎の人においても変化しないので、特に高齢者は摂取量すべてを B₁₂ 強化食品や B₁₂ を含むサプリメントから摂取する必要がある。

3. 利用を阻害する化合物

3-1. ビタミン C

ビタミン C (C) と微量元素元素の作用により B₁₂ が分解されることが報告されている。³⁵⁾ これは C と金属元素の反応により生じたラジカルにより B₁₂ が分解されると推定されている。また、その分解物は B₁₂ 酵素系を阻害すると報告されている。³⁶⁾ また、C 大量投与を受けたヒトで低血清 B₁₂ 値が報告されたが、³⁷⁾ 最近の研究では、C の大量投与が血清 B₁₂ 値を低下させることも B₁₂ 欠乏症を促進させることもないようである。³⁸⁾

3-2. 葉酸

高濃度の葉酸摂取は B₁₂ 欠乏症の影響を和らげるが、葉酸の摂取あるいは栄養状態が B₁₂ の要求性を変化させるという証拠は

ない。²⁴⁾一方、葉酸の大量投与は高齢者において血清 B₁₂ 値を減少させる傾向があり、注意を喚起する報告もある。^{39, 40)}

3-3. 薬剤

B₁₂ の吸収に影響を及ぼす薬剤を表-1 に示す。⁴¹⁾

表-1 B₁₂ の吸収に影響を与える薬剤

薬剤	推定される作用
ビグアニド	吸収の減少
コレステラミン	IF の阻害
コーチシン	消化酵素の阻害
ネオマイシン	腸壁の障害
経口避妊薬	組織分布の変化
パラ-アミノシアル酸	吸収の減少
塩化カリウム	回腸 pH の低下

引用文献

1. ビタミン B₁₂, ビタミンの辞典 (日本ビタミン学会編), p324-353, 朝倉書店, 1987
2. Seethanram B, Alpers DH: Cobalamin binding proteins and their receptors. In: Vitamin receptors-vitamins as ligands in cell communication (ed by Dakshinamurti K), p 78-105, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
3. Moestrup SK, Kozyraki R, Kristiansen M, Kaysen JH, Rasmussen HH, Brault D, Pontillon F, Goda FO, Christensen EI, Hommond TG, Verroust PJ: J. Biol. Chem., 273, 5235-5242, 1999.
4. Moestrup SK, Brin H, Fischer PB, Peersen CM, Verroust PJ, Sim RB, Christensen EI, Nexø E: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8612-8617, 1996.
5. 渡辺文雄, 日本農芸化学会誌, 73, 807-815, 1999.
6. Watanabe F, Nakano Y, Tachikake N, Tamura Y, Yamanaka H, Kitaoka S, Haga S, Imai S, Saido H: Int. J. Biochem., 23, 531-533, 1991.
7. Watanabe F, Saido H, Yamaji R, Miyatake K, Isegawa Y, Ito A, Yubisui T, Rosenblatt DS, Nakano Y: J. Nutr., 126, 2947-2951, 1996.
8. Chen Z, Banerjee R: J. Biol. Chem., 273, 226248-226255, 1998.
9. EL Kholty S, Gueant JL, Bressler L, Djalai M, Boissel P, Gerard P, Nicolas JP: Gastroenterology, 101, 1399-1408, 1991.
10. 渡辺文雄, 中野長久: ビタミン B₁₂, 日本臨床, 57, 2205-2210, 2000.
11. Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y: J. Nutr., 125, 2846-2850, 1995.
12. Chanarin I. et al.: Blood, 66, 479-489, 1985.
13. Houetto P, Hoffman JR, Imbert M, Levillain P, Baud FJ: Lancet, 346, 605-608, 1995.
14. Foresti R, Clark JE, Green CJ, Motterlini RJ: J. Biol. Chem., 272, 18411-18417, 1997.

15. Uchiyama M. et al.: *Neurosci. Lett.*, 192, 1-4, 1995.
16. Kawata T. et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38, 305-316, 1992.
17. 日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究 平成13年度総括・分担研究報告書 (厚生科学研究費補助金21世紀型医療開拓推進研究事業)
18. 竹中重雄 (大阪府立大学) 私信
19. 平岡真美, 安田和人: *ビタミン学会誌*, 74, 271-280, 2000.
20. 河田哲典ら: *ビタミン学会第49回大会要旨 (ビタミン学会誌, 71, 202, 1997)*
21. 食肉の栄養成分と調理による変化2 (牛/豚6部位+内臓の微量成分)財団法人日本食肉消費総合センター(平成3年度食肉消費改善総合対策事業)
22. Watanabe F, Abe K, Fujita T, Goto M, Hiemori M, Nakano Y: *J. Agric. Food Chem.*, 46, 206-210, 1998.
23. Watanabe, F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Zakir Hussain Mazumder, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y: *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5177-5180, 1998.
24. Vitamin B₁₂: In Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington DC, p 306-356, 1998.
25. Mollin DL, Ross GI: *J. Clin. Pathol.*, 5, 129-139, 1952.
26. Pfeiffer CM, Smith SJ, Miller DT, Gunter EW: *Clin. Chem.*, 45, 2236-2242, 1999.
27. Carmel R: *Clin. Chem.*, 48, 407-409, 2002.
28. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, Rothenberg SP, Fedosov SN, Sundrehagen E, Orning L: *Clin. Chem.*, 48, 526-532, 2002.
29. 5訂日本食品標準成分表, 科学技術庁資源調査会編, 2000.
30. Watanabe F, Takenaka S, Kittaka-Katsura H, Ebara S, Nakano Y: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48, 352-331, 2002.
31. Watanabe F, Katsura H, Takenaka S, Fujita T, Abe K, Tamura Y, Nakatsuka T, Nakano Y: *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4736-4741, 1999.
32. Watanabe F, Takenaka S, Katsura H, Miyamoto E, Abe K, Tamura Y, Nakatsuka T, Nakano Y: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2712-2725, 2000.
33. Kittaka-Katsura H, Fijita T, Watanabe F, Nakano Y: *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4994-4997, 2002.
34. Takenaka S, Sugiyama S, Ebara S, Miyamoto E, Abe K, Tamura Y, Watanabe F, Tsuyama S, Nakano Y: *Brit. J. Nutr.*, 85, 699-703, 2001.
35. Takenaka S, Sugiyama S, Watanabe F, Abe K, Tamura Y, Nakano Y: *Biosci.*

- Biotech. Biochem., 61, 2137-2139,
1997.
36. 近藤春樹, 寺田洋臣, 井関徹, 岩佐小緒
理, 奥田桂子, 金沢正一郎, 奥田邦雄 :
日本血液学会誌, 49, 1338-1346, 1986.
37. Herbert V, Jacob SE: JAMA, 230,
241-242, 1974.
38. Simon JA, Hudes ES: Arch. Intern. Med.,
159, 619-624. 1999.
39. Tucker KL, Mahnken B, Wilson PWF,
Jacques P, Selhub J: JAMA, 276,
1879-1885, 1996.
40. Oakley GP: Am. J. Clin. Nutr., 65,
1889-1990, 1997.
41. Ovesen L: Drugs, 18, 278-298, 1979.

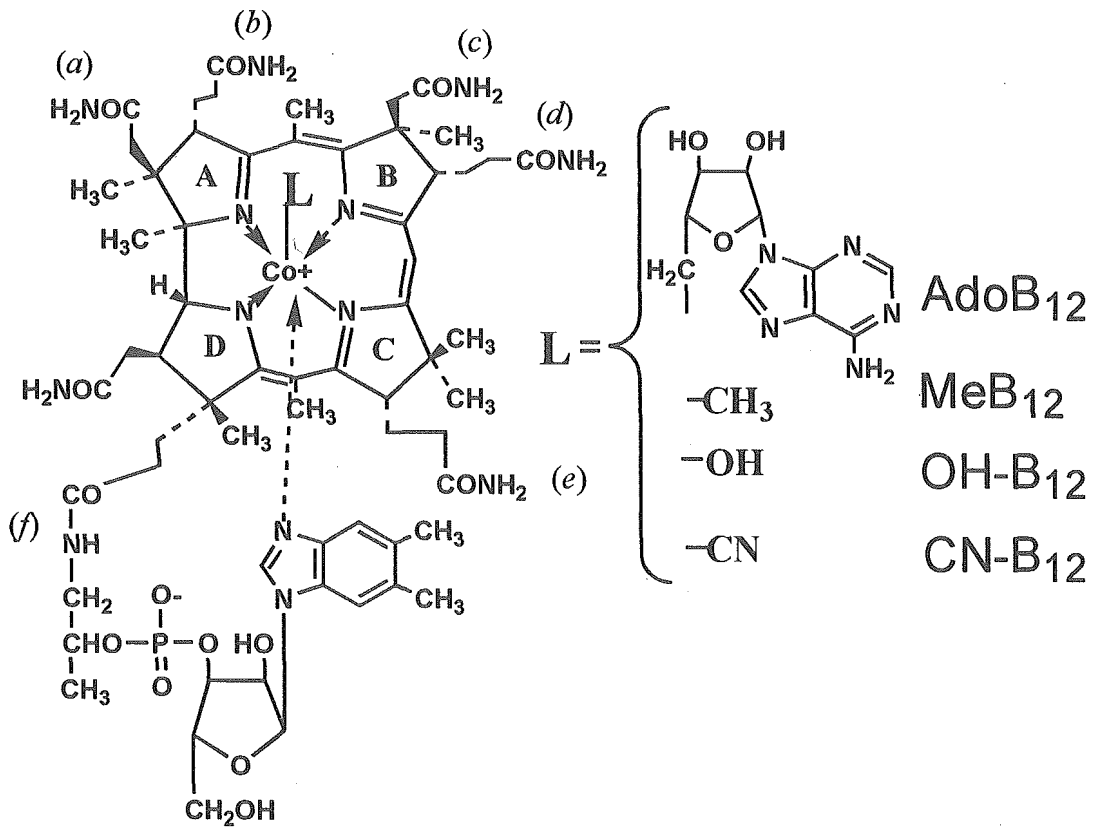


図-1 ビタミン B₁₂ の構造式