

Pattern of Niacin Catabolites, the Most
Reliable Index of niacin Status, in Humans, *J
Nutr Sci Vitaminol*, 48,417-419.2002

Hidemi Okamoto, Aya Ishikawa, Mamoru,
Nishimuta, Naoko Kodama, Yutaka
Yoshitake, Tsutomu Fukuwatari, Katsumi
Shibata.

② Diurnal Variations in human urinary
excretion of nicotinamide catabolites: effects
of stress on the metabolism of nicotinamide.

Am J Clin Nutr, 2003,77;2,406-410

Hidemi Okamoto, Aya Ishikawa, Yutaka
Yoshitake, Naoko Kodama, Mamoru
Nishimuta, Tsutomu Fukuwatari, and
Katsumi Shibata.

G. 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.

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パントテン酸ー

リサーチレジデント 太田万理 滋賀県立大学人間文化学部 客員研究員

研究要旨

第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、パントテン酸の栄養所要量がはじめて策定された。しかしながら、策定の科学的に根拠となるデータは必ずしも十分ではなく、日本でのデータの蓄積が求められている。本年度においては、成人女性および男性を対象として水溶性ビタミンヒト試験を実施し、一定期間、所要量に見合った試験食を摂取し、サプリメントとして所要量と同量のビタミン混合物を摂取させた。ビタミン混合物に含まれるパントテン酸量は5mg/dayで、1日3回に分けて摂取させ、血液および尿を採取し、試料中のパントテン酸量を微生物定量法により分析した。これらの結果から、血液中では成人女性 2.47 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 、男性 2.45 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ とパントテン酸の動的平衡がほぼ保たれていると考えられた。しかしながら尿中においては成人女性 19.49 $\mu\text{mol}/\text{day}$ 、男性 8.08 $\mu\text{mol}/\text{day}$ と性差がある可能性が考えられた。またパントテン酸の生物有効性や過剰害、調理損耗についてのデータが少ないことから、これらに関しさらなる検討が必要である。

A. 目的

パントテン酸は第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において初めて栄養所要量が策定された水溶性ビタミンである。パントテン酸は2,4-デヒドロキシ-3,3-ジメチルブチル酸（パント酸という）とβ-アラニンが酸アミド結合したものである。

パントテン酸の生理作用は補酵素型の Coenzyme A (CoA) 及び 4'-ホスホパンテテインとして発揮される。構造式を図 I-1 に示した。

パントテン酸の生理機能は、CoA やアシルキャリアアプロテイン(ACP)の補欠分子族である 4'-ホスホパンテテイン(4'-phospho-pantetheine)の構成成分として、脂質の代謝を中心に機能することであり、糖および脂質の代謝とのかかわりが深い。

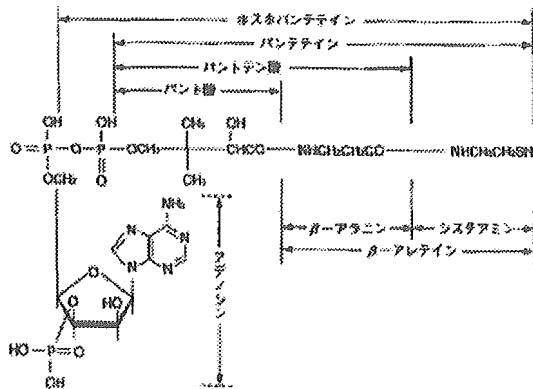


図 I-1 CoA の化学構造

また、生体内では酸化還元反応や転移反応、加水分解反応など、ほとんどすべてのタイプの反応に関与し、140 種類以上の酵素の補酵素として機能している。

パントテン酸は多くの食品中に広く含まれているため一般に欠乏症は殆ど存在していないと考えられているが、潜在的欠乏については明らかではない。動物・植物中に存在するパントテン酸の形態は遊離型のパントテン酸より結合型の方が多い。従って、食事として摂取するパントテン酸は、主として CoA やパンテテイン誘導体の形が多い。しかし、腸管から吸収される時には、小腸

内の酵素によってパンテテインにまで加水分解され、吸収される。

一方、パントテン酸の所要量は第六次改定栄養所要量-食事摂取基準-においては適正摂取量 (AI) として求められており、成人で 5 mg/day であり、男女の差は設けられていない。なお妊婦、授乳婦の付加量はそれぞれ +1 mg/day, +2 mg/day となっている。許容上限摂取量はデータ不足のため策定されていない。

このように、策定の根拠となる日本人のデータが十分でないことから、本年度も昨年度に引き続き、健全な日本人の成人を対象とし栄養所要量の妥当性の科学的根拠を示すため実験を行った。

現在の栄養所要量の妥当性を示すため、成人男女各 10 名 (19~23 歳) を被験者とし、栄養所要量 (生活活動強度 II に設定) に従った栄養素を含む精製食を 7 日間投与し続けた時の血中、尿中のパントテン酸量を測定し、過去の報告値と比較した。また乳幼児の栄養において重要である母乳中のパントテン酸量について分析を行った。

B 研究方法

パントテン酸の測定には乳酸菌の一種である *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 による微生物定量法を用いる。

本菌は、遊離のパントテン酸にしか応答しない。食品中には CoA や CoA 合成系における中間代謝産物など結合型として存在しているものが多いため、これらパントテン酸結合物をすべて遊離のパントテン酸とする処理が必要である。種々の結合型パントテン酸の栄養学的機能を明らかにするため、将来的に結合型パントテン酸の新規簡易測定法の開発が望まれる。

パントテン酸は中性では比較的安定であるが、強い酸およびアルカリ条件では不安定で加水分解をうけて、β-アラニンとパント酸あるいはパントラクトンに分解される。

全血および尿中のパントテン酸の分析手順を示したものが図 II-1 である。

図 II-1 全血および尿中パントテン酸の測定手順

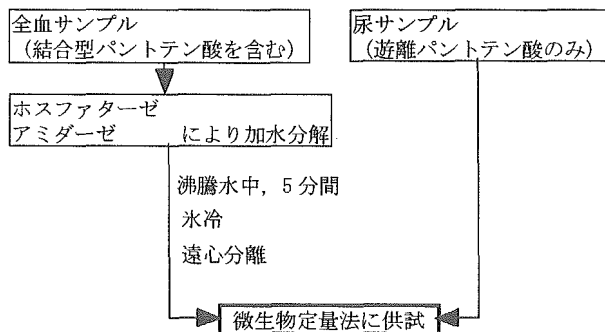


図 II-1 のように結合型パントテン酸を含むサンプルに対しては酵素処理を行い、パントテン酸を遊離させた後微生物測定法に供する。

現在行われている測定方法に関わる問題点と改良方法は、

- 1) 結合型パントテン酸を酵素を使用せずに、遊離型のパントテン酸にする方法の開発
- 2) CoA-SH のより高感度の測定方法の開発
- 3) パントテン酸を水系の反応で蛍光物質に変換し、HPLC 法で測定する方法の開発
- 4) パントテン酸-CoA 生合成経路中間体の測定方法の開発。具体的にはパンテテインの測定方法の開発

以上の点が考えられる。

2-1 保存用培地および斜面培地の作成方法

保存培地の組成を表 II-1 に示した。

表 II-1 保存用培地の組成

組成	g
酵母エキス粉末	2.0
プロテオースペプトン	0.5
グルコース	1.0
リン酸一カリウム, KH_2PO_4	0.2
寒天	1.5
水道水	94.8

1- 上記試薬を 200 ml のビーカーに順次入れていき、沸騰水中で完全に溶解させる。

2- 溶解した保存用培地（あついで注意すること）を約 5 ml ずつ（5 ml の駒込ピペットを使用）ねじ口試験管（15 ml 用）に分注し、軽くふたをして 10 分間、 121°C 、プラス 1 気圧でオートクレーブした後、室温に放置して固める。その際、半分は垂直に立てて冷却し（保存用培地）、残りの半分は斜めにして固める（斜面培地）。

2-2 液体培地の作成方法

保存用培地の組成から寒天をのぞいた液体培地を 100 ml 作成し、微生物定量用試験管（ 12×100 mm）に 5 ml ずつ分注し、アルミキャップをして、10 分間、 121°C 、プラス 1 気圧でオートクレーブにかけた後、氷冷する。冷蔵庫で保存しておく。

2-3 接種用菌液の作成方法

1- *L. plantarum* の植えてある保存用培地（保存培地への植え継ぎは 2 週間に 1 回行う。植え継いだ時は 37°C で 18 時間培養した後、冷蔵庫で保存する）から菌体を一白金耳取り、斜面培地に塗布する。 37°C で 24 時間培養する。

2- 24 時間培養した斜面培地から菌体を一白金耳取り、新しい斜面培地に塗布する。 37°C で 24 時間培養する。

3- 作成した液体培地に、斜面培地から菌体を一白金耳取り、 37°C で 16 時間培養する。

4- これを 3000rpm で 5 分間遠心分離を行い、沈殿部分の菌体を得る。この菌体を滅菌した 5ml の滅菌した 0.9%食塩水に懸濁し、再び遠心分離し、菌体を洗浄する。この洗浄操作を計 3 回行う。

5- 最終的に集めた菌体を 5ml の滅菌 0.9%食塩水に懸濁させる。さらに、その懸濁液を 0.05ml を 5ml の滅菌した 0.9%食塩水に懸濁させる。これを接種用菌液とし、0.05ml ずつ定量用試験管（定量用培地が 2ml の時）に分注する。

2-4 パントテン酸定量用培地の作成方法

定量用基礎培地の組成を表 II-2 に示した。実際には、日水製薬（株）製のパントテン酸定量用培地を使用する。

パントテン酸定量用培地を 7.7g 秤量し、80ml の水を加え、加温溶解後、全容を 100ml にする。これが、定量用 2 倍濃度基礎培地となる。

表 II-2 パントテン酸定量用基礎培地
(2 倍濃度の基礎培地 100 ml 中の量)

カゼイン (酸加水分解物)	1.0g	チアミン-HCl	200 µg
グルコース	4.0g	リボフラビン	200 µg
酢酸ナトリウム	1.2g	ニコチン酸	200 µg
L-シスチン	20mg	ピリドキシン	400 µg
L-トリプトファン	20mg	ビオチン	0.5 µg
アデニン	1.0mg	p-アミノ安息香酸	20 µg
グアニン	1.0mg	塩類溶液 A	2 ml
キサンチン	1.0mg	塩類溶液 B	2 ml
ウラシル	1.0mg		

塩類溶液 A = KH_2PO_4 10 g と K_2HPO_4 10g を 200 ml の水に溶解したもの。

塩類溶液 B = $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g を 200 ml の水に溶解。

2-5 パントテン酸の定量操作方法

表 II-3 に示した組成のものを検量線用として使用する。

表 II-3 パントテン酸の定量操作方法
(全容量, 2ml)

試験管 No	パントテン酸量 (nmol /tube)	2 倍濃度基礎	パントテン酸標準液 (1 nmol/ml) (ml)	0.5 M KP B, pH 7.0	H ₂ O (ml)
1	0	1	0	0.2	0.800
2	0.010	1	0.010	0.2	0.790
3	0.025	1	0.025	0.2	0.775
4	0.050	1	0.050	0.2	0.750
5	0.075	1	0.075	0.2	0.725
6	0.100	1	0.100	0.2	0.700
7	0.200	1	0.200	0.2	0.600
8	試料	1	測定試料	0.2	0.790
**			0.005~ 0.800ml		~0

		培地 (ml)		(ml)	
1	0	1	0	0.2	0.800
2	0.010	1	0.010	0.2	0.790
3	0.025	1	0.025	0.2	0.775
4	0.050	1	0.050	0.2	0.750
5	0.075	1	0.075	0.2	0.725
6	0.100	1	0.100	0.2	0.700
7	0.200	1	0.200	0.2	0.600
8	試料	1	測定試料	0.2	0.790
**			0.005~ 0.800ml		~0

- 上記の溶液をパントテン酸定量用試験管に分注する。検量線用、試料共に 3 連で行うが、Tube Number 1 については、1 本には菌を接種しないこと（雑菌の繁殖がないことを確かめるため）。
- 分注した試験管にアルミキャップをし、オートクレーブする（121°C、プラス 1 気圧、5 分間）にかける。圧力が常圧に戻ったら直ちに氷冷する。
- 調製した接種菌液を 0.05ml ずつ分注する。
- 菌を接種した試験管を 37°C で 20 時間培養する。
- 分光光度計を 660nm の波長に合わせ、Tube Number 1 の欠菌の試験管で 0 合わせを行う。
- Tube Number 1（菌を接種）の吸光度が 0 であることを確認後、すべての試験管の吸光度を測定する。なお、測定する際には懸濁液を均一化後、測定すること。

図 II-2 に検量線の一例を示した。

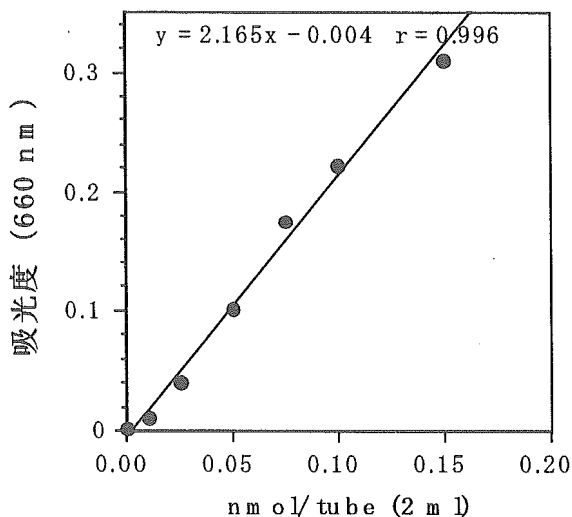


図 II-2 パントテン酸濃度に対する *L. plantarum* のレスポンス

2-6 血液など生体試料中のパントテン酸の抽出方法

血液など生体試料を材料とした時の総パントテン酸の抽出方法を図 II-3 に示した。この方法で作成した試料中には遊離型パントテン酸と結合型パントテン酸が存在している。結合型を遊離型にするには図 II-4 に示した酵素処理を行う必要がある。この分解処理後の試料を使用すれば、全パントテン酸量を測定することができる。

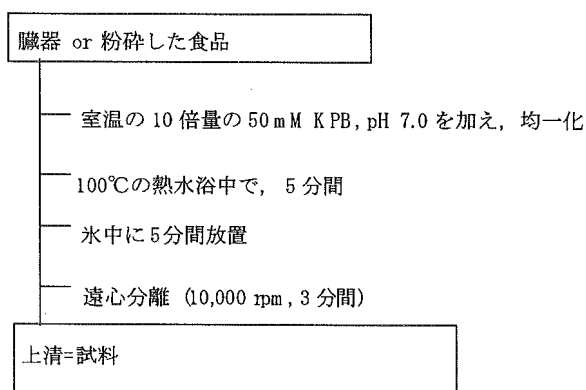


図 II-3 臓器あるいは固形食品からの総パントテン酸抽出法

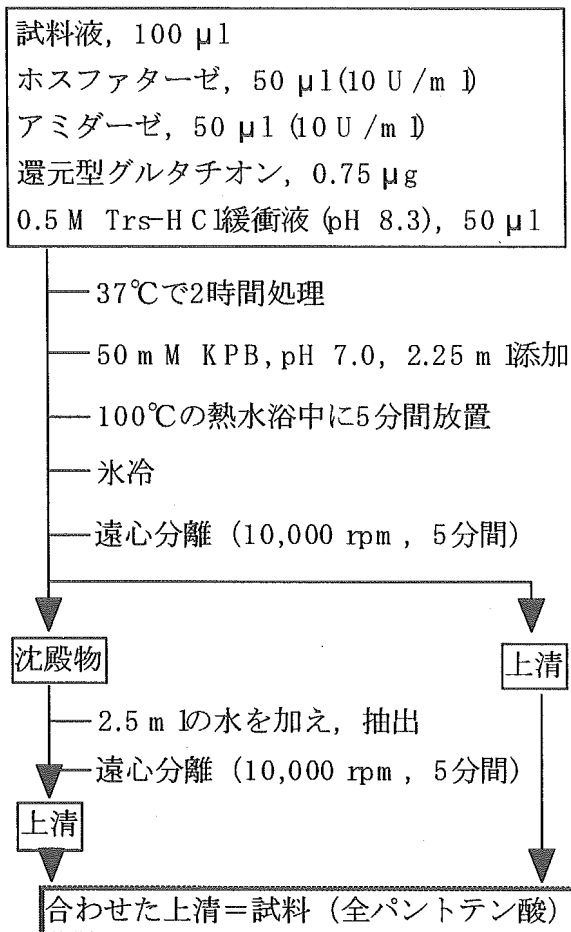


図 II-4 結合型パントテン酸の加水分解法

総パントテン酸含量を求めるためには、図 II-4 に示した方法で加水分解を行った後、測定すること。

2-7 尿中のパントテン酸の定量方法

体内での形は結合型が主であるが、尿中には全て遊離パントテン酸の形で排泄される。従って、尿を直接試料として使用できる。

具体的には、日本人の成人の尿中パントテン酸排泄量の概数は $10 \mu\text{mol/day}$ である。1日の尿量を 1000 ml と仮定すると、 10 nmol/ml 、すなわち $0.01 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ となる。従って、表 II-3 の Tube Number 8 ~**において試料を $20 \mu\text{l}$ とすれば、検量線の中央部へくる。

パントテン酸を測定する場合は、排尿後すぐに冷蔵庫で保存し、24時間尿として蓄尿後は、1日尿量を計測後、一定量を取り出し、 -80°C で保存すれば1年間は損失することはない。

パントテン酸の日本人における体内動向を検討するため、成人女性および成人男性を対象としたヒト試験を行った。成人女性 10 名は、2002 年 2 月 28 日～3 月 7 日の期間、成人男性 10 名は 2002 年 8 月 28 日～9 月 7 日の期間に実施した。ヒト試験の詳細については以下に示すとおりであるが、成人男性および女性に 1 日当たり 5mg のパントテン酸を 3 回の試験食毎に分けて与え、全血中および尿中の総パントテン酸濃度の変化を経時的および経日的に解析した。

C. 研究成果

成人の全血中総パントテン酸量は、試験開始日（試験1日目）で女性平均 2.31 nmol/ml (0.51 μg/ml)、男性平均 2.36 nmol/ml (0.52 μg/ml) であり、これまでの基準値と同等値を示していた（図 III-1, 表 III-1）。試験4日目において女性の全血中総パントテン酸量は 2.58 nmol/ml (0.57 μg/ml)、男性においては 2.09 nmol/ml (0.46 μg/ml) と第1日目と較べ有意な差は認められなかった。

全血中の総パントテン酸濃度は成人女性での結果と成人男性のそれとの間に差異は認められなかった（図 III-1, 表 III-1）。

全血中総パントテン酸量においては表 III-2, 表 III-3 のように経日的な変化はなかった。

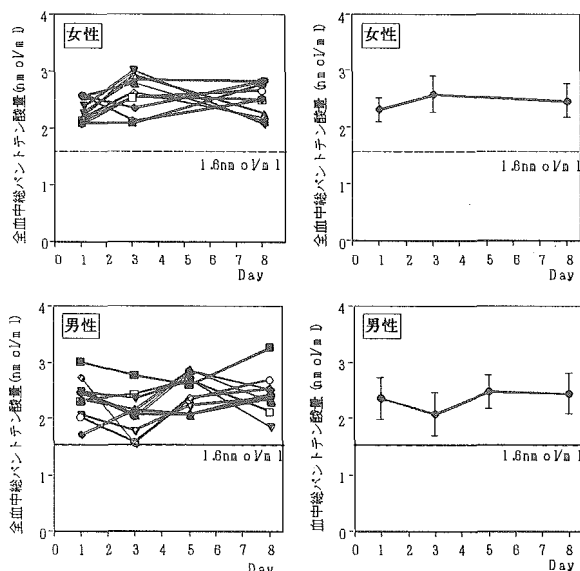


図 III-1 成人女性、男性における全血中総パントテン酸レベルの変動

表 III-1 成人における全血中総パントテン酸レベルの個人データ（最終日）

採血日	総 PaA (nmol/ml)	
	女性	男性
7日目	2.79	2.44
	2.83	2.53
	2.52	2.30
	2.13	1.86

	2.08	2.12
	2.49	2.53
	2.18	2.69
	2.65	2.35
	2.26	2.37
	2.82	-
平均 PaA (nmol/ml)	2.47	2.45
SD	0.30	0.37

表 III-2 成人女性における全血中総パントテン酸の変動

採血日	n	全血中総パントテン酸	
		(nmol/ml)	(μg/ml)
2002/3/1	10	2.31	0.51
/3/5	10	2.58	0.57
/3/8	10	2.47	0.30

表 III-3 成人男性における全血中総パントテン酸の変動

採血日	n	全血中総パントテン酸	
		(nmol/ml)	(μg/ml)
2002/8/27	10	2.36	0.52
/8/29	10	2.09	0.46
/9/1	10	2.48	0.54
/9/3	10	2.45	0.54

一方、成人の尿中のパントテン酸排泄量は、試験開始から7日目において女性平均 19.49 μmol/day (4.0 mg/day) であったのに対し、男性では平均 7.74 μmol/day (1.7 mg/day) と両者の間に差がみられた（図 III-2, 表 III-4）。試験実施時期が女性は3月、男性は9月であったことから季節的な代謝量の変化による可能性も考えられる。

クレアチニン比でみると、女性では 1.03

mmol/molCre であるのに対して、男性では 0.56 mmol/ molCre と差異がみられた。

経日的変化は男性、女性、共に実験開始から 3 日間で落ち付く感があり、最終日には一定範囲内の値に収束した (表 III-4, 左)。

また摂取量に対する尿中パントテン酸排泄率(%) は試験最終日(7 日目)において女性 79.3 %と高い値であったのに対し、男性では 33.95 %と女性の半値であった (図 III-4)。

図 III-2 成人における尿中排泄パントテン酸レベル

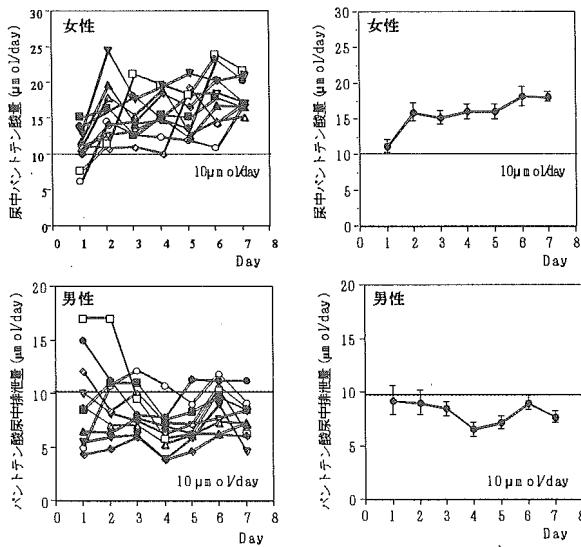


表 III-4 成人における尿中パントテン酸レベルの個人データ (最終日)

採取日	総 PaA (µmol/day)	
	女性	男性
最終日	16.70	8.53
	17.25	6.04
	20.31	11.21
	16.75	7.27
	21.17	8.44
	21.72	6.32
	17.25	8.57
	17.20	9.16
	15.33	7.19
	17.29	-

平均 PaA (µmol/day)	19.49	8.08
SD	0.17	1.84

図 III-4 成人における摂取量に対する尿中パントテン酸の排泄量

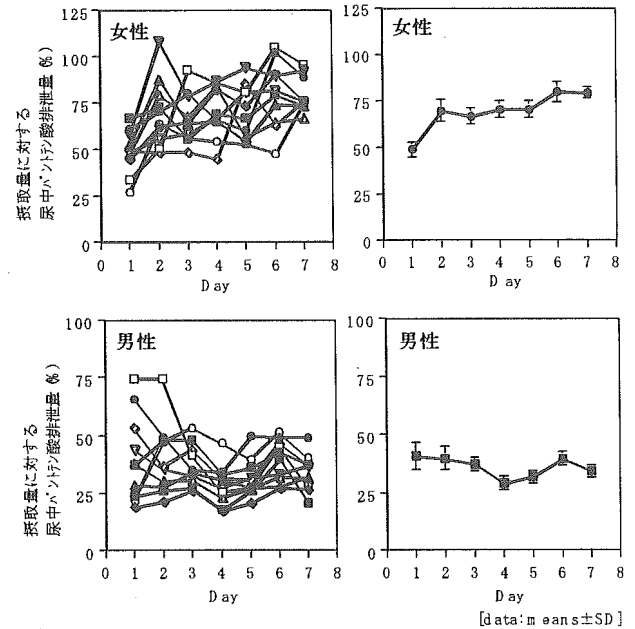
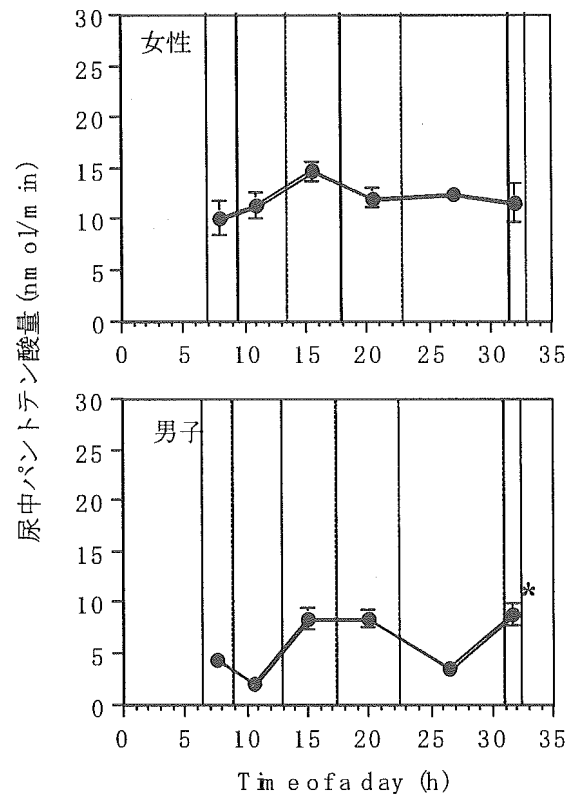


図 III-5 尿中パントテン酸排泄量の日内変動



*有意差あり ($P > 0.05$, Repeated measures ANOVA)

試験6日目には分割尿を採取し、パントテン酸の尿中排泄量を調べ、日内変動を観察した(図III-5)。この結果に対し、反復測定分散分析(repeated measured ANOVA)を行ったところ、男性においてパントテン酸の尿中排泄量に有意な日内変動が認められた。なお女性では有意差はなかった。

男性のパントテン酸尿中排泄量は昼食時までは低く、昼食後から就寝前までが高かったが、女性では有意差はないものの15時前後のみ高い値であった。

一方、母親の食生活と大きな関わりがあり、また乳幼児の栄養所要量の策定において重要とされる母乳中のパントテン酸含量を調べた。

表III-5に母乳中のパントテン酸含量を測定した結果を示す。

本結果はこの研究への参加を承諾した授乳婦から提供された母乳の値である。

母乳中におけるパントテン酸含量は総パントテン酸量として平均29.9 nmol/ml (6.6µg/ml)であった。

また母乳中においてパントテン酸は遊離が約7割、結合型が約3割の比率で存在することを明らかにした。母親のパントテン酸摂取量と母乳中のパントテン酸含量との相関について未だ明らかでないことから、今後さらなる検討が必要である。

表III-5 母乳中のパントテン酸含量

	総パントテン酸量 (nmol/ml) (µg/ml)	遊離パントテン酸量 (nmol/ml) (µg/ml)	結合型パントテン酸量 (nmol/ml) (µg/ml)
M001	39.19 8.59	29.77 6.53	9.42 2.07
M002	64.55 14.15	64.21 14.08	0.34 0.07
M003	29.32 6.43	20.24 4.44	9.08 1.99
M004	40.91 8.97	23.34 5.12	17.57 3.85
M005	25.18 5.52	18.75 4.11	6.43 1.41
M006	40.68 8.92	21.96 4.81	18.72 4.1

M009	23.35 5.12	11.98 2.63	11.37 2.49
M010	42.97 9.42	32.41 7.11	10.56 2.32
M011	36.66 8.04	21.96 4.81	14.7 3.22
M012	20.71 4.54	16.91 3.71	3.8 0.83
M013	18.23 4	16.23 3.56	2 0.44
M016	32.19 7.06	15.42 3.38	16.77 3.68
M017	19.97 4.38	13.77 3.02	6.2 1.36
M018	14.4 3.16	13.31 2.92	1.09 0.24
M019	24.84 5.45	10.95 2.4	13.89 3.05
M025	27.37 6	23.63 5.18	3.74 0.82
M026	22.28 4.89	19.27 4.22	3.02 0.66
M027	30.28 6.64	25.08 5.5	5.2 1.14
M028	33.55 7.36	32.35 7.09	1.2 0.26
M029	27.37 6	26.17 5.74	1.2 0.26
M030	22.65 4.96	22.54 4.94	0.11 0.02
M031	30.28 6.64	23.99 5.26	6.29 1.38
M032	36.28 7.95	30.06 6.59	6.22 1.36
M033	22.28 4.89	17.81 3.91	4.47 0.98
M034	23.01 5.04	20.36 4.46	2.65 0.58
平均 PaA ±SD	29.94±10.57 6.56±2.32	22.90±10.50 5.02±2.30	7.04±5.70 1.54±1.25

D. 考察

本研究により第六次改定日本人の栄養所要量 - 食事摂取基準- において定められた所要量を摂取した際の健常な日本人における体内パントテン酸量(全血中総パントテン酸量, 尿中パントテン酸量)を明らかにした。この結果より現行の所要量に関し、過去の文献値と比較し考察する。

4-1 健常人の血液中濃度

血中パントテン酸濃度は摂取量に対し変化が少

ないことが知られており、このことは本試験結果において全血中総パントテン酸濃度のばらつきが少ないことから理解できる。

表 IV-1 に過去の文献値と本試験での全血中総パントテン酸の値をまとめた。

パントテン酸の動態は摂取量に伴わず尿中の値が変化し、その後血中の値に影響が出るため血液中の値が変化し難いと考えられる。

表 IV-1 ヒト全血中の総パントテン酸含量

文献	全血 (nmol/ml)
	1.57-2.66
K. Ishiguro (1971) ¹	4.00
A.F. Fredrickson (1957) ²	2.10±0.12
M. Hatano (1962) ³	2.12±0.19
I. Masugi (1972) ⁴	1.28±0.14
B. R. Eissenstat (1986) ⁵	男性 (14-19 歳, 平均 16.1 歳) : 1.88±0.47 PaA 摂取量 : 4.14±1.21 mg/day : 2.34±0.42 mg/1000kcal 女性 (13-17 歳, 平均 15.2 歳) : 1.57±0.52 PaA 摂取量 : 6.25±2.07 mg/day, : 2.17±0.39 mg/1000kcal
柴田らの実験, 2002 年 3 月実施, 20 歳前後の女子学生	2.5 nmol/ml (5mg 投与) 一定の食事管理下での実験
柴田らの実験, 2002 年 9 月実施, 20 歳前後の男子学生	2.5 nmol/ml (5mg 投与) 一定の食事管理下での実験

4-2 健康人の尿中パントテン酸排泄量

尿中に排泄されるパントテン酸はすべて遊離型のパントテン酸であり、尿中排泄量は摂取量と高い相関があるが、血中の濃度は変化が少ないことが知られている。

パントテン酸の栄養学的な指標となる生体成分は尿中排泄量と考えられる。

表 IV-3 にこれまでの報告における尿中パントテン酸排泄量の値と本試験の結果を示す。

表 IV-3 パントテン酸の尿中排泄量

文献	尿中排泄量	備考
C.W. Denko (1947) ⁶	4.2-5.3 mg/day (19.2-24.2 μmol/day)	日常食
	2.7-3.5 mg/day, 平均 3.4mg (12.8-16.0 μmol/day, 平均 15.5 μmol/day 平均尿中排泄量: 約 70%	平均 4.7 mg (21.46 μmol/day) のパントテン酸 摂取量
H. M. Fox (1961) ⁷	3.9 mg/day (17.8 μmol/day) 平均尿中排泄量: 約 60%	6.7 mg (30.6 μmol/day) のパントテン酸摂取量
J. Fitzpatrick (1950) ⁸	2.5-9.6mg/day (11.41-43.83 μmol/day)	日常食
V. Schmidt (1951) ⁹	子供 2.5mg/day (=11.4 μmol/day) 成人 2.7mg/day (=12.33 μmol/day) 老人 2.3mg/day (=10.5 μmol/day)	日常食
小柳達夫 (1969) ¹⁰	平均で 2.3 mg/day (10.5 μmol/day) 平均尿中排泄量: 約 90%	寮の学生, 日常食, 2.5-2.6mg (11.4-12.4 μmol/day) のパントテン酸摂取量
	平均で 6.3mg/day (28.77 μmol/day) 平均尿中排泄量: 約 50%	寮の学生, 日常食, 2.5-2.6mg (11.4-12.4 μmol/day) +10mg (45.7 μmol/day) のパントテン酸摂取量 (総計, 12.5-12.6mg=57.1-57.5 μmol)

B. R. Eissenstat (1986) ¹¹	男性：1.71±0.68 mmol/mol cre. 女性：2.37±0.96 mmol/mol cre.	(14-19歳，平均16.1±1.7歳) PaAの摂取量，4.14±1.21 mg/d: 2.34±0.42 mg/1000kcal (13-17歳，平均15.2±1.3歳) PaAの摂取量，6.25±2.07 mg/d, 2.17±0.39 mg/1000kcal
M. Hatano (1962) ¹²	成人尿： 11.86～26.00 μmol/day	
柴田らの実験-1 2002年3月実施	18 μmol/day (4 mg/day) 1.8 mmol/mol creatinine	20歳前後の女子学生 (5mg投与) 一定の食事で管理下での実験
柴田らの実験-2 2002年9月実施	10 μmol/day (2.2mg/day) 0.7 mmol/mol creatinine	20歳前後の男子学生 (5mg投与) 一定の食事で管理下での実験

表IV-3より，体内のパントテン酸レベルの飽和値は尿中パントテン酸排泄量にして約10 μmol/day，摂取量5 mgに対する尿中排泄率として60%が指標となるレベルと考えられる．本ヒト試験では一日当りの尿中パントテン酸排泄量が女性では18 μmolと十分飽和していたが，男性では10 μmolであり，さらに検討する必要がある．

4-3 母乳中のパントテン酸含量

第六次改定日本人の栄養所要量では「母乳のパントテン酸量は，0.14～0.67 mg/100mlとばらついているが，英国の場合は0.22～0.27 mg/100ml，日本での成乳のパントテン酸量は0.21～0.35 mg/100mlである．そこで母乳のパントテン酸量を0.24 mg/100mlとした」と記載されている．本研究結果0.69±0.31 mg/100mlと比較すると本研究値は高い値を示した．このことはパントテン酸測定時における結合型パントテン酸処理方法の

違いによると考えられる．

本研究では結合型パントテン酸の処理方法として食品成分表など広くその方法が採用されている，小腸ホスファターゼと鳩肝アミダーゼによる処理方法（二重酵素法）を用いた．

この方法はパピイン等を用いる他の方法より高い値となるが，このことは本研究で用いた二重酵素処理法により，より完全に結合型のパントテン酸が遊離型となったと推察される．

同じ二重酵素処理法を用いたJohnsonらの報告では母乳中のパントテン酸含量は平均0.67 mg/100mlとあり，本結果に近いものである．ちなみにパントテン酸の分析に用いられる*L. plantarum*は遊離型のパントテン酸しか利用できない．

4-4 パントテン酸必要量についての検討

第六次改定日本人の栄養所要量の策定では，通常の食事でパントテン酸が不足することはないこと，パントテン酸の摂取量や安全性に関する報告があまり多くないこと，などから必要量及び許容上限摂取量は設定されていない．

また男女間の直接的な比較はあまり行われていないとのことから，全ての年齢において性差は考慮されていない．

わが国の第六次改定の成人におけるパントテン酸所要量の策定では米国の報告を基にしている．米国における食事調査の結果，パントテン酸の摂取量が概ね5 mg/dayであること，さらにこの摂取量において不十分とするデータがないことから日本人のパントテン酸適性所要量を5 mg/dayと定めている．

本ヒト試験においても一日のパントテン酸投与量を成人男性，女性共に5 mgとした結果，全血中総パントテン酸レベルは，成人男性，女性においてほぼ一定値を示した．尿中へのパントテン酸排泄量は，成人女性では，平均18 μmol/day (3.9 mg/day)であった．成人男性では，10 μmol/day (2.2 mg/day)と，女性と比較差が見られた．成人女性

においては尿中排泄量の結果から問題のない数値だと考えられる。また男性においては尿中排泄量がやや低い結果となったが、この投与量を不十分とするデータが少ないことから、成人男性においてはさらに検討する必要がある。

また、策定時において、パントテン酸の摂取量について十分なデータがない場合は、乳児及び成人の摂取量から外挿する場合があります、母乳中のパントテン酸含量は特に乳幼児の所要量策定において重要である。本ヒト試験ではこれまでの報告よりやや高い結果となり、これには測定方法によるものが大きく関与していると考えられる。今後測定方法による値の変動について調査することが必要である。

パントテン酸に関するこれまでの食事調査やヒト試験は十分でなく、現在文献検索を行っており、来年度には科学的な根拠をまとめることが期待できる。また、パントテン酸の生物利用効率や調理による損耗についてさらにデータの集積に努めたい。

E. 健康危機情報

特記する情報はなし。

F. 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回大会で発表（2003年5月29・30日）

G. 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

引用文献

1. K. Ishiguro, *Vitamins*, 44, 96-99, 1971
2. A.F. Fredrickson, *Arch. Dermatol.*, 75, 134, 1957
3. M. Hatano, *J. Vitaminol.*, 8, 134, 1962
4. I. Masugi, *Vitamins*, 46, 261-265, 1972
5. B. R. Eissenstat *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 44, 931-937, 1986
6. C.W. Denko, *et al.*, *Arch. Biochem.*, 13, 481, 1947
7. H. M. Fox, H. Linkwiler, *J. Nutr.*, 75, 451, 1961
8. J. Fitzpatrick, S.L. Tompsett, *J. Clin. Path.*, 3, 69, 1950
9. V. Schmidt, *J. Gerontol.*, 6, 132, 1951
10. 小柳達夫ら, *ビタミン*, 40, 27, 1969
11. B. R. Eissenstat *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 44, 931, 1986
12. M. Hatano, *J. Vitaminol.*, 8, 134, 1962
13. L. Johnson, L. Vaughan and H.M. Fox, *Am J Clin Nutr*, 34, 2205, 1981

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－葉酸－

分担研究者 渡邊敏明 姫路工業大学 教授

研究協力者 福井徹 病体生理研究所 室長

研究要旨

第六次改定日本人の栄養所要量・食事摂取基準において、葉酸の栄養所要量がはじめて策定された。しかしながら、策定の科学的エビデンスはほとんどすべてが欧米の資料に基づいており、わが国のエビデンスは僅かであった。本年度においては、成人女性および男性を対象として、一定の期間、所要量に見合った試験食を摂取し、サプリメントとして所要量と同じ量のビタミン混合物を摂取させた。ビタミン混合物に含まれる葉酸は200 μ gで、1日に3回に分けて摂取させ、血液および尿を採取し、葉酸レベルおよび葉酸代謝の関わっているホモシステインレベルについて、化学発光免疫測定法で分析をした。これらの結果から、血液中では葉酸の動的平衡がほぼ保たれていると考えられた。しかしながら、来年度においては、葉酸測定法について、葉酸特異性について検討が必要である。さらに葉酸必要量の指標として、ホモシステインとの関連性などの検討が必要である。

A. 目的

葉酸は、N-ヘテロ環のプテリジンと p-アミノ安息香酸からなるプテロイル基、つまり 4- [((2-アミノ-4(3H)-オキソプテリジン-6-イル)メチル)アミノ] 安息香酸に 1~7 個の L-グルタミン酸が結合したプテロイル (ポリ) グルタミン酸である。食品に含まれるのは、プテロイルポリグルタミン酸型であり、小腸粘膜でモノグルタミン酸型となり、吸収される。血漿や尿中では、モノグルタミン酸型、組織中ではポリグルタミン酸型としてタンパク質と結合した形で機能している。なお、小腸粘膜では、プテリジン環が還元されてテトラヒドロ型となり、さらにメチルテトラヒドロ型となる。還元型葉酸は、細胞内では補酵素として、ヌクレオチド類の生合成やメチル基の生成転換系などに関与している。また、アミノ酸やタンパク質の代謝などにも不可欠であり、グリシン、セリン、メチオニンの代謝やビタミン B₁₂ とともにホモシステインからメチオニンの生成などにも関与している。

葉酸の生理機能としては、正常な造血機能を保つために重要であるばかりでなく、成長や妊娠の維持にも欠かせないビタミンである。このため、欠乏症状としては、造血機能に異常が生じ、巨赤芽球性貧血や神経障害が知られている。最近、多くの疫学調査によって、葉酸が、胎児における神経管閉鎖障害の発症リスクの低減に効果があることが認められている。また、葉酸の摂取量が低下すると、血漿ホモシステインの上昇が見られ、動脈硬化症と関連がある血液凝固因子や血管内皮細胞に影響している。

葉酸の所要量は、わが国では食事から摂取可能な量として、成人で 200 μ g/日であるが、米国では 400 μ g/日となっている。なお、妊婦および授乳婦での付加量は、それぞれ 200 および 80 μ g/日となっている。葉酸の摂取量が、1 日あたり 320 μ g 以上であれば、血漿のホモシステインレベル

を一定に保つことができる。このことから、米国では穀類に葉酸を 140 μ g/100g 添加するように勧告している。わが国でも、1 日に 350g の野菜を摂取するように勧めている。許容上限摂取量は 1mg/日となっているが、これ以上摂取すると葉酸過敏症 (発熱や蕁麻疹など) を起こすことがある。

このように、葉酸の栄養所要量を策定するために、その根拠となる科学的エビデンスは必ずしも十分でなく、わが国での新しいデータの蓄積と解析が求められている。そこで、本年度においては、健常な成人男女を対象にして、所要量に見合った水溶性ビタミンをサプリメントとして与え、葉酸の出納を検討した。

B. 研究方法

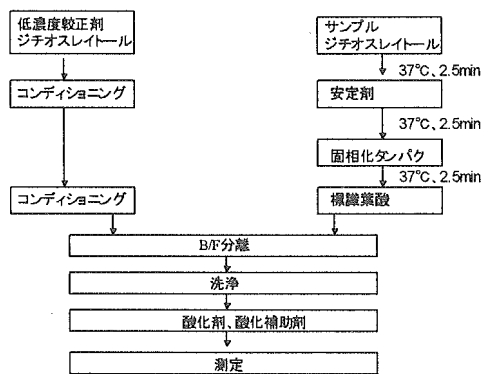
葉酸の測定は、これまで乳酸菌の一種である *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 による微生物学的定量法とラジオアッセイが用いられていた。近年、化学発光免疫法に基づく分析が主流になっている。

五訂日本食品標準成分表に掲載されている葉酸は、微生物学的定量法で測定された値である。この定量法は、化学発光法に基づく分析法に比べ、精度が低く、熟練が必要とされている。しかしながら、化学発光法は、血清に比べ、食品には種々の成分が含まれているために、化学発光法を適用するには、煩雑で、困難である。また、乳酸菌 *L. rhamnosus* ATCC 7469 に対する葉酸の化学構造的な特異性についても、明らかにされていない。このような問題があるが、食品中の葉酸の分析には微生物学的定量法が用いられている。

血清および尿中の葉酸の分析手順を示したものが図 3 である。また、化学発光免疫測定法の原理は下記のとおりである。測定機器としては、Centaur ケミルミアナライザー ACS180 および IMULIZE2000 を使用している。

- 1) 葉酸の遊離：Dethiothreitol、KC1、NaOH
によってタンパクから解離
- 2) 競合反応：磁性鉄微粒子、acridinium ester
標識葉酸
- 3) B/F 分離：磁気力を利用、上清分離除去
- 4) 励起：acridinium ester の酸化、開裂、励
起状態の中間体
- 5) 発光測定

図1. 血清および尿中葉酸の測定手順



このようにサンプルをジチオスレイトールで処理し、タンパクから遊離させた後、分析に供する。本法の最小検出感度は 0.5ng/ml (1.1pmol/mL) であり、プール血清で測定した葉酸値は 5.77ng/ml (13.1pmol/mL) であった。尿中の葉酸については、正常参考値となるような参考資料などが無いので、血清と同じ測定条件で行った。なお、化学発光免疫法においても葉酸の結合タンパク質との特異性が問題となる。

葉酸の出納を検討するために、成人女性および成人男性を対象としたヒト試験を2回行った。成人女性10名は、2月28日-3月7日の期間、成人男性10名は8月28日-9月7日の期間に実施した。ヒト試験の詳細については、他に示したとおりであるが、成人男性および女性に1日当たり $200\mu\text{g}$ (男性 $7.2\mu\text{mol/kg}$ 、女性 $7.9\mu\text{mol/kg}$) の葉酸を

3回の試験食に分けて与え、血清および尿中の葉酸濃度の変化を経時的および経日的に解析した。

C. 研究成果

図2. 成人女性における血清葉酸レベルの個人変動

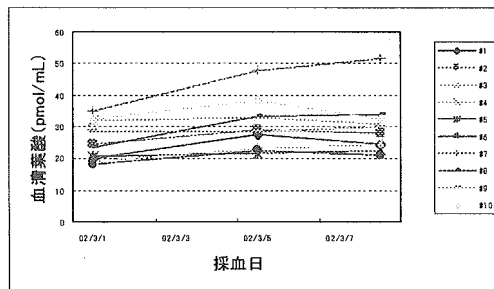
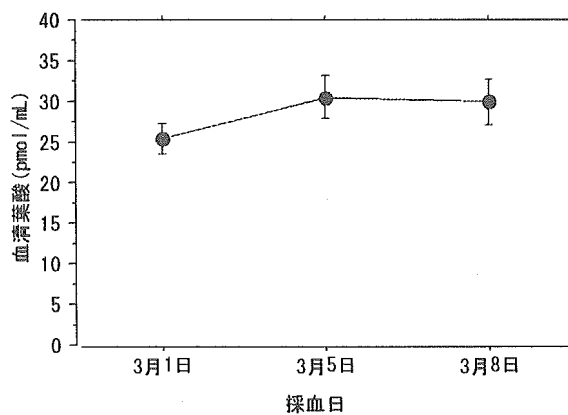


図3. 成人女性における血清葉酸レベルの変動



成人女性の血清中葉酸レベルは、試験は開始日(試験1日目)で、 25.4pmol/mL (11.2ng/mL) であり、これまでの基準値と較べて高い値を示していた(図1, 2; 表1)。試験4日目では、 30.5pmol/mL と第1日目と較べて、有意に増加していた。

表1. 成人女性における血清葉酸レベルの変動

採血日	被験者数	血清葉酸	
		pnom/mL	ng/mL
3月1日	10	25.4±6.1	11.2±2.7
3月5日	10	30.5±8.0**	13.5±3.6
3月8日	10	30.0±8.8**	13.2±3.9

** p<0.01, 3月1日との比較.

成人女性の尿中の葉酸排泄量は、試験開始6日目で平均22.7pmol/day (9.7 μg/day)であった(図4)。今回は、現在使用している化学発光免疫定量法によって、測定が可能か否か検討したもので、経日的分析はしていない。また、基準値についても、明らかではなく、来年度において検討が必要である。

表2. 成人女性における尿中葉酸レベル

被験者	尿中葉酸	
	pmol/day	μg/day
#1	29.0	12.8
#2	25.1	11.1
#3	22.0	9.7
#4	20.4	9.0
#5	20.6	9.1
#6	21.0	9.3
#7	22.6	10.0
#8	20.5	9.0
#9	23.1	10.2
#10	22.9	10.1
m±SD	22.7±2.7	9.7±0.7

3月6日測定.

男性を対象にしたヒト試験の結果では、血清の葉酸濃度は、男性19.5pmol(8.6ng)/mLと、女性25.4pmol(11.2ng)/mLに比べ、明らかな差異が認められた(図4, 表3)。女性では4日目で29.9pmol(13.2ng)/mLと有意に上昇したが、男性では減少した。このように体内での葉酸の動態に性差が認められた。

尿中排泄量は、女性では22.0nmol(9.7 μg)/日であったのに対して、男性では20.9nmol(9.2 μg)/日

との差異はみられなかった(図5, 6)。クレアチニン比で見ると、女性では2.2nmol/molCre(8.9 μg/gCre)であるのに対して、男性では1.48nmol/molCre(6.24 μg/gCre)、と差異がみられた。

男性では、総摂取量に対する総排泄量は6日間で32.3%であり、日内変動が認められたが、経日的な変化はみられなかった(図7, 8)。このことから、血液中では動的平衡がほぼ保たれていると考えられた。さらにホモシステインとの関連などの検討が必要である。

図4. 成人男性における血清葉酸レベルの個人変動

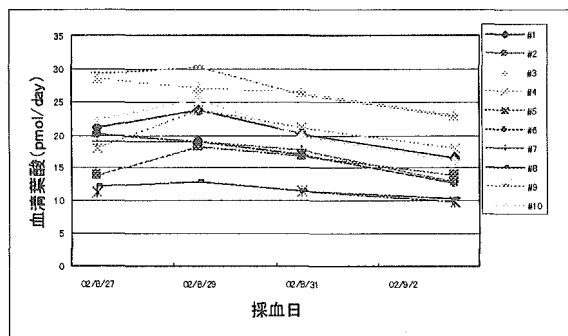


表3. 成人男性における血清葉酸レベルの変動

	採血日	採血日				
		8月27日	8月29日	8月31日	9月3日	
血清葉酸 (ng/mL)		19.6±6.2	22.1±5.3	18.8±5.1	15.6±4.6	
		(pmol/mL)	8.6±2.7 ^a	9.8±2.3 ^{bc}	8.3±2.2 ^{acd}	6.9±2.0 ^b

図5. 尿中に排泄された葉酸の個人変動

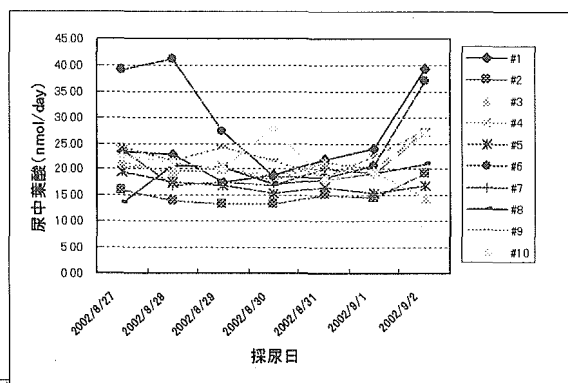


図6. 尿中に排泄された葉酸の変動

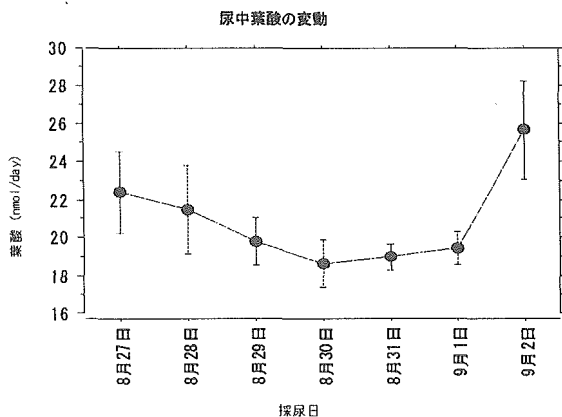
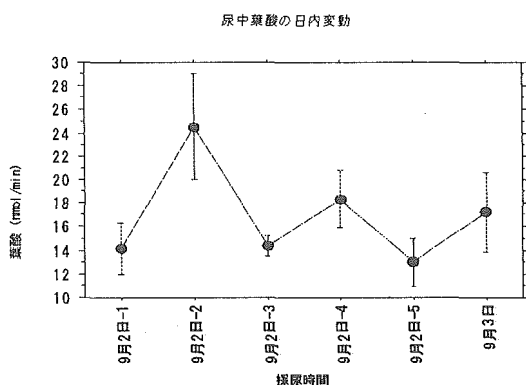
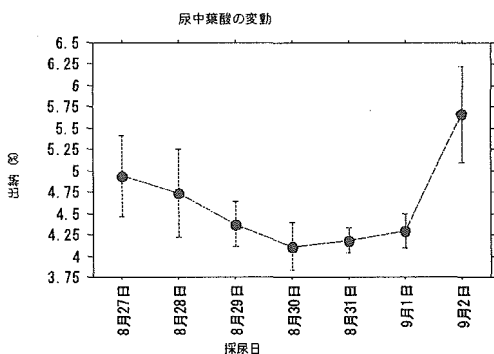


図7. 尿中葉酸排泄量の日内変動



試験6日目に定期的に採尿し、葉酸の排泄量を見たものが、図7である。この結果を見ると、早朝において葉酸の排泄量が高い値と示した。午後から夜にかけては、あまり変動は認められなかった。なお、女性では葉酸の日内変動は観察していない。

図8. 尿中葉酸の出納



D. 考察

1. 葉酸欠乏の指標について

下表は、葉酸摂取量の指標となるものをまとめたものである(表4)。これらの指標の中で、これまで一般的に用いられてきたものは血清葉酸レベルである。多くの分析データがあり、血液生化学的指標として用いられている。葉酸が不足すると、血清葉酸レベルが低下するとともに、ホモシステインが蓄積する。このため血清ホモシステインレベルが高くなり、尿中のホモシステイン排泄が多くなる。このため、ホモシステインは感度の良い指標となることが考えられている。しかし、ホモシステインについてはデータの蓄積が多くなく、血清葉酸レベルも併用すべきであると考えられる。

表4. 葉酸摂取量についての指標と基準値

指標	基準値
血清葉酸	2.4-9.8 ng/mL (5.4-22.2pmol/mL)
赤血球葉酸	200-800ng/mL (0.45-1.8nmol/mL)
巨赤芽血球	37ng/10 ⁹ 細胞
血清ホモシステイン	1.89mg/L<(14 μmol/L<)
尿中ホモシステイン	
血液像 (MCV: 平均赤血球容積)	

米国の栄養所要量の策定では、葉酸の平均必要量は血清葉酸レベル、赤血球葉酸濃度、血漿ホモシステイン濃度、血液学的検査(赤血球数、網赤血球数、平均赤血球容積値、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度)を基準範囲に維持できる食事と定めている。わが国の第六次改定の所要量の策定で用いられた根拠は、欧米の報告を基にしている。

2. 葉酸必要量についての検討

これまでに行われたおもな栄養疫学調査およびヒト出納試験の結果をまとめたものが、表1で

ある。摂取量は、1日あたり 100-489 μg で、食事およびサプリメントの形で与えられている。葉酸レベルは葉酸の摂取量が 300 μg 以下では減少しており、200 μg 以上では一定あるいは増加を示している。一方、ホモシステインレベルをみると、報告数が十分ではないが、葉酸摂取量が 300 μg 以下では明らかに増加している。これらの結果を基に、葉酸の必要量を考えると、1日あたり 200~300 μg の間にあると推定することができる。これまでの食事調査やヒト試験は十分でなく、現在システマチック文献検索を行っており、来年度には科学的なエビデンスを得ることが期待できる。また、昨年度および今年度行ったヒト試験についても、血清および尿中のホモシステインを分析しシステマチックな検討を行う予定である。

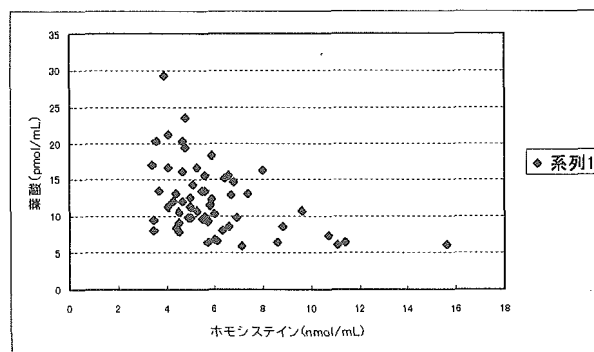
表 5. 葉酸摂取量と血清中の葉酸およびホモシステインとの関連

	葉酸 摂取量	葉酸 血清	葉酸 赤血球	血清 ホモシステイン
Sarberlich et al. 1987				
3	100	減少	減少	-
	200	一定	減少	-
Jacob et al. 1994				
10	151	正常	正常	異常
Milne et al. 1986				
40	200	減少	減少	増加
O'Kerfe et al. 1988				
5	319	減少(3)	減少(3)	増加(2)
6	489	一定	一定	一定
彦根 (成人女性) 2002				
10	200	増加	-	-
彦根 (成人男性) 2002				
9	200	減少	-	-

図 9 は、成人女性 60 名における葉酸摂取量、血清葉酸レベルおよび血清ホモシステインレベルを見たものである。血清葉酸レベルの低い女性でホモシステインレベルの高いヒトが多数みられた。しかしながら、食事からの葉酸摂取量とホ

モシステインとの関連は観察されなかった。

図 9. 成人女性における血清葉酸レベルとホモシステインレベルとの関連



3. 今後の課題

血清ホモシステインレベルは、血清葉酸レベルあるいは葉酸の摂取量と関連があるとの報告がある。またホモシステインは、詳細な発症メカニズムは不明であるが、動脈硬化症や神経管閉鎖障害の誘発に関わっている。このため、ホモシステインを葉酸必要量の指標として考えることは、科学的根拠に基づくもので、非常に有用かつ重要である。しかしながら、一炭素単位代謝系には、葉酸以外にもビタミン B12 およびビタミン B6 が関わっているため、これらのビタミンうち 1 つでも不足していると、ホモシステインの増加することが考えられる。このようなことから、葉酸の必要量を考える場合には、ホモシステインのみでなく血清葉酸レベルも考慮して、評価する必要がある。

E. 結論

1. サプリメントとして葉酸 200 μg を試験食と一緒に食べていると、血清葉酸レベルは、成人女性では 4 日目で有意に上昇したが、成人男性では、減少がみられた。
2. 化学発光免疫測定法で、尿中葉酸の測定が可能であるが、詳細な検討が必要である。
3. 尿中にも葉酸の排泄が見られ、成人女性では、平均 22.0nmol(9.7 μg)/日であった。成人男性では、20.9nmol(9.2 μg)/日と、女性と差異はみられなかった。

- | | |
|--|--------------------|
| 4. ホモシステインレベルとの関連や血清および尿中の日内変動などの検討が必要である。現在、イムライズによる葉酸およびホモシステインの分析を検討している。 | なし
3. その他
なし |
|--|--------------------|

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe, T., Ohkawa, K., Kasai, S., Ebara, S., Nakano, Y., and Watanabe, Y.: The effects of dietary vitamin B12 deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. Cong. Anom., 43, 2003(in press).
- 2) 大川恵子、葛西重信、渡邊敏明、野田博昭： δ -トコフェロールによる THP-1 細胞のアポトーシス誘導. 生物ラジカル研究所平成 14 年度報告書、43-47、2003.
- 3) 葛西重信、大川恵子、渡邊敏明、野田博行：白血球細胞におけるサイトカイン及び活性酸素産生評価. 48-53、生物ラジカル研究所平成 14 年度報告書、2003.

2. 学会発表

- 1) 谷口歩美、渡邊敏明：電子スピン共鳴装置を利用したビオチン測定法の開発. 日本栄養・食糧学会代 41 回近畿支部大会、28、2002.
- 2) 渡邊敏明、福井徹：健常成人におけるビオチンの必要量に関する検討. 第 56 回日本栄養・食糧学会講演要旨集. 201、2002.
- 3) 渡邊敏明、若林一郎、榎原修平、中野長久：ビタミン B12 欠乏状態のラット精子形成に及ぼす影響. 日本ビタミン学会第 52 回大会、226、2002.

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. 実用新案特許