

20030455

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
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

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柴田 克己

平成 16 (2004) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	
1. 平成 15 年度の成果の要約	001
柴田克己	
II. 水溶性ビタミン関連物質の定量方法	
1. ビタミン B ₁	009
柴田克己	
2. ビタミン B ₂	019
柴田克己	
3. ビタミン B ₆	032
柴田克己	
4. ビタミン B ₁₂	042
柴田克己	
5. ナイアシン	051
柴田克己	
6. パントテン酸	065
柴田克己	
7. 葉酸	072
柴田克己	
8. ビオチン	082
柴田克己	
9. ビタミン C	088
柴田克己	
10. トリプトファン-キノリン酸代謝関連物質	094
柴田克己	
III. ヒトを用いた水溶性ビタミンの食事摂取基準の検討	
1. 尿中への排泄量からみた水溶性ビタミンの栄養評価 (女子学生)	108
柴田克己	
2. ヒトにおける水溶性ビタミンの摂取量と尿中への排泄量との関係 -体内飽和量を求めるための研究-	115
柴田克己	
3. 食品中の B 群ビタミンの生物利用率の測定方法の開発	126
柴田克己	
4. ニコチンアミドの添加は <i>de novo</i> ニコチンアミド生合成経路に影響を及ぼさない (ヒト)	133
柴田克己	
5. 水溶性ビタミンの大量摂取 1 週間後の尿中水溶性ビタミン排泄量 -水溶性ビタミンのクリアランスの比較-	143
柴田克己	
IV. 食事摂取基準のための資料	
1. ビタミン B ₁	150
柴田克己	
2. ビタミン B ₂	167
早川享志	
3. ビタミン B ₆	175
早川享志	
4. ビタミン B ₁₂	183
梅垣敬三	
5. ナイアシン	187
福渡努, 柴田克己	
6. パントテン酸	198

	太田万理, 柴田克己	
7.	葉酸	216
	渡邊敏明, 福井徹, 瀧本秀美, 岡純	
8.	ビオチン	221
	渡邊敏明, 福井徹	
9.	ビタミンC	224
	梅垣敬三	
V.	分担研究者・研究協力者の報告書	
1.	水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 -ビタミンB ₁ -	228
	福渡努	
2.	水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 -ビタミンB ₂ -	235
	福渡努	
3.	水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 -パントテン酸-	241
	福渡努	
4.	栄養所要量に従った食事摂取時のトリプトファン-ナイアシン転換係数	249
	福渡努	
5.	内分泌攪乱物質候補フタル酸エステルによるトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用-マウスにおける影響-	259
	柴田克己	
6.	内分泌攪乱物質候補ビスフェノールA, スチレンモノマーによるトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用	266
	福渡努	
7.	水溶性ビタミンの許容上限摂取量の検討 -ナイアシン-	276
	福渡努	
8.	水溶性ビタミンの食事摂取基準の妥当性の検討-ナイアシン(高齢者)-	285
	福渡努	
9.	雄ラットの発育に伴うビタミンB ₁₂ 欠乏状態の精子形成に及ぼす影響	289
	渡邊敏明	
10.	日本人女性の母乳中ビオチン, パントテン酸およびナイアシンの含量	293
	渡邊敏明	
11.	わが国の食品に含まれるビオチン量の分析	305
	渡邊敏明	
12.	水溶性ビタミンの食餌摂取基準の妥当性の検討 -測定技術と基準値の検討-	320
	橋詰直孝	
13.	離乳前乳児の哺乳量に関する研究	327
	戸谷誠之	
14.	日本人の水溶性ビタミン摂取量について	334
	平岡真実, 安田和人	
15.	デヒドロアスコルビン酸の生理活性	347
	小城勝相	
16.	日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究-第4回講演会- 元気なカラダとビタミン摂取-水溶性ビタミンの必要量について-	353
	渡邊文雄	
17.	日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究-第5回講演会- 食品中のビタミンはどれくらい吸収・利用されるの	418
	柴田克己	
VI.	研究成果の刊行に関する一覧表	439
VII.	研究成果の刊行物・別刷	441

平成 15 年度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

I. 総括研究報告

1. 平成 15 年度の成果の要約

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

1. 第六次改定日本人の栄養所要量－食事摂取基準－に従った時の尿中の水溶性ビタミン値の提示とその利用
2. 生活習慣病一次予防のための日本人の食事摂取基準算定のための基礎実験
3. 食品中のビタミンの生体利用率算定のための実験
4. ナイアシンの食事摂取基準策定に関する基礎的研究
5. 母乳中のビタミン含量の測定
6. 主要な食品中のビオチン含量の測定
7. 動物を使用した許容上限摂取量の算定に関する基礎的実験
8. ビタミンB₁₂欠乏に関する研究
9. ビタミン定量方法の精度向上に関する研究
10. ビタミン必要量に影響を与える食品汚染物質の検索とその対策
11. 二度講演会を開催（高知市と京都市）
12. 第55回日本ビタミン学会で「水溶性ビタミンの食事摂取基準」という特別な分類で10題発表

1) 第六次改定日本人の栄養所要量－食事摂取基準－に従った時の尿中の水溶性ビタミン値の提示とその利用

第六次改定食事摂取基準に従った精製食投与時の成人の尿中の水溶性ビタミン値を平成14年から平成15年にかけて行った計3回の実験から、水溶性ビタミン栄養状態の指標として図1に示した結論を得た。血液は一定値以上にはならない。体内には飽和量がある。健常者では一定の値を示す。必要量以下の摂取日が続く、欠乏症が顕在化する直前で、はじめて低下してくる。つまり、欠乏の診断には適している。一方、尿の値は、摂取量の低下がすぐに反映される。欠乏の予防つまり栄養状態の指標には適している。

平成13年度～15年度にかけておこなった3回の実験から、20～22歳の男女に第六次改定日本人の栄養所要量に従った合成食を投与した時の尿中の値と文献値から、栄養状態の判定のために、図2に示した対照値を設定した。記載のないビタミンに関しては、今後検討する。

この対照値の利用の一例として、これからの日本の食育の中核をなす女子学生が一般的に選択する食事を摂取した時の尿中の値を測定し、ビタミンの栄養評価を行った。この評価例の被験者は7名の女子学生で、食事は彼女らが

通常摂取している代表的な1日メニューを設定し、4日間全員同じ食事を摂らせた。その結果、図3に示したように、ビタミンB₁で8割、B₂で9割が対照値よりも低い被験者が認められた。すなわち、今回の被験者が選択した食事では、ビタミンB₁とビタミンB₂摂取量が必要量に達していないと判定した。なお、この実験期間のビタミン摂取量を実測した結果、ビタミンB₁は1日当たりで0.52 mg、B₂が0.87 mg、B₆が1.05 mg、ナイアシン当量が27.6 mg、パントテン酸が9.3 mg、ビタミンCが115 mgであった。尿中の値から判定された結果とほぼ同じ判定が得られた。これらのことから、精度が低く、面倒で、ストレスのかかる食事調査をしなくても、尿中のビタミン排泄量を測定すれば、精度高くビタミンの栄養状態を判定できることが、はじめて明確に示すことができた。

2) 生活習慣病一次予防のための日本人の食事摂取基準算定のための基礎実験
B群ビタミンの所要量は欠乏を予防する値を指標として策定されている。しかし、ビタミンCのみは、欠乏の予防が指標ではなく、抗酸化作用と疾病予防効果が期待できる血漿濃度で尿中排泄量を最小限にとどめ

る量,いわゆる生体飽和値に近い値から策定されている。B群ビタミンもビタミンCと同じ考え方で算定した場合,どの程度の量になるかを調べた。

多くのヒトは,通常の仕事をしている時は,食事から摂れる栄養素で十分であるが,非常に仕事量が増えた時,環境が悪化した時あるいは負荷がかかった時にはビタミンの必要量が増すのではないかと考えている。このような背景から,ビタミン栄養補助食品が出回っている。薬と勘違いして,つつい即効性を期待して,大量に摂取してしまうことがある。このような背景から,食事摂取基準では許容上限摂取量の策定がなされた。悪影響がないからといって,体内飽和量を超えて摂取しても,尿中に排泄されるだけで,無駄である。そこで,女子学生6名を被検者として,水溶性ビタミンの体内飽和量を調べた。実験期間は4週間で,第1週目の1日目~4日目は食事摂取基準にほぼ従った規定食を作成し,摂取させた。尿は,4日目の24時間尿を集め,ビタミン量を分析した。第1週の5日から7日は被検者の負担軽減のために自由食とした。ただし,次のデータを得るために,水溶性ビタミン混合を所要量通り含んだパウダーを摂取させた。第2週の1日目~4日目は規定食+水溶性ビタミン混合を所要量通り含んだパウダーを摂取させた。尿は,4日目の24時間尿を集め,ビタミン量を分析した。5日目~7日目は自由食とし,水溶性ビタミン混合を所要量の3倍量含んだパウダーを摂取させた。第3週の1日目~4日目は規定食+水溶性ビタミン混合を所要量の3倍量含んだパウダーを摂取させた。尿は,4日目の24時間尿を集め,ビタミン量を分析した。5日目~7日目は自由食とし,水溶性ビタミン混合を所要量の6倍量含んだパウダーを摂取させた。第4週の1日目~4日目は規定食+水溶性ビタミン混合を所要量の6倍量含んだパウダーを摂取させた。尿は,4日目の24時間尿を集め,ビタミン量を分析した。被検者は,4日目の24時間尿の最終尿,5日目の第1回目の尿を排泄した午前6時30分頃で実験終了とした。図4のグラフは,縦軸が尿中に排泄されたナイアシン異化代謝産物量を,横軸がナイアシン当量摂取量を示す。横軸は対数表示である。二つの直線の交点が体内のナイアシン量が飽和に達し,その結果,尿中への排泄量が急激に増大したことを意味すると考えられる。ナイアシン当量の場合,500 μ mol/dayつまり,ニコチンアミドとして60 mg/dayが飽和値であることがわかった。

所要量は6.3 mg/1000 kcalであるので,単位をあわせると,34.5 mg/1000 kcalとなる。このような方法で,他のビタミンの飽和点を求めた結果をまとめたのが,図5である。この図において,二列目が第六次改定の所要量,三列目が飽和点,四列目が飽和点の量を所要量でわった時の倍数である。ビタミンB₁では2.9倍,B₂では4.6倍,B₆では3.7倍,ニコチンアミドでは5.5倍,パントテン酸では4.8倍,葉酸では3.9倍,ピオチンでは3.3倍,Cでは1.9倍であった。

3) 食品中のビタミンの生体利用率算定のための実験

食品中のビタミンがどれだけ消化・吸収・利用されているのか,すなわち生体利用率を調べるための実験方法を確立した。図6に,実験計画の概略を示した。第1週目の1日目から4日目は規定食を与えた。尿は,4日目の24時間尿を採取した。この尿中に含まれるビタミン量をData 1とした。5日目~7日目は,被検者の負担を軽減するために自由食とした。ただし,1日目~4日目の食事に含まれている水溶性ビタミン量とほぼ同じ量の合成ビタミン混合を付加させた。第2週目の1日目~4日目は,第1週と同じ規定食を摂取させた。尿は,4日目の24時間尿を採取した。この尿に含まれるビタミン量をData 2とした。生体利用率の計算は,図6に示したように,Data 2の尿中ビタミンB₁排泄量から添加した合成ビタミンB₁量からData 1の尿中B₁排泄量を引いた値を,添加した合成B₁摂取量で割った値をAとした。一方で,Data 1の尿中B₁排泄量を食事中から摂取したB₁量でわった値をBとした。生体利用率はBをAで割って,100をかけた値とした。

この方法で,求めた生体利用率をまとめたものを図7に示した。ビタミンB₁は平均値で66%,最小値が42%で最大値が87%であった。B₂は64%で,41~90%の値であった。B₆は75%で,66~80%の値であった。ナイアシンは70%で,35~80%であった。パントテン酸は70%で,51~78%であった。

4) ナイアシンの食事摂取基準策定に関する基礎的研究

4-1) ニコチンアミドは *de novo* ニコチンアミド合成経路を阻害しない

水溶性ビタミンには特殊なビタミンがある。ナイアシンであるが,トリプトファンから生合成されている。このことが,ナイ

アシンの所要量策定の精度に大きく影響を与えている。図8にトリプトファン-ナイアシン生合成経路の概略を示した。

de novo 生合成経路においては、最終産物が中間代謝酵素を阻害することによって、体内濃度の恒常性を維持している。我々は、トリプトファン-ナイアシン転換率が多くの栄養因子によって変動することを証明してきた。しかしながら、この *de novo* ニコチンアミド合成経路が摂取ニコチンアミド量によって影響を受けるか否かについては調べていなかった。実験方法は、基本的には、水溶性ビタミンの体内飽和量を求めた時の実験方法と同じである。結果は図9に示した。図9-Fに示したように、ニコチンアミド異化代謝産物は摂取量の増大に伴って増大した。この事実は、確かにニコチンアミドが体内に摂取され、代謝されていることを示している。このような状態でも、図9-A-Eに示したように、トリプトファン-ナイアシン生合成中間代謝産物量は、摂取ニコチンアミド量の増大によって変動しなかった。この結果は、*de novo* ニコチンアミド合成経路はニコチンアミドの摂取量とは関係なく作動していることを意味しており、ニコチンアミドの摂取量に応じて、トリプトファン-ナイアシン転換効率を変動させる必要がないことがはじめて明らかとなった。

4.2) トリプトファン-ニコチンアミド転換効率

トリプトファン-ナイアシン転換効率は、栄養因子によって大きく変動する。そこで、第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-に従った時のトリプトファン-ナイアシン転換効率を調べた。被検者は10名の女子学生である。実験期間は7日間で、毎日採尿を行い、経日変動も調べた。食事は合成食で、この食事は全くナイアシンそのものは含まれていない。図10-Aは個人の値をプロットしたもので、Bと書いてあるグラフが平均値である。縦軸の数値の見方は、60という数値は60 mgのトリプトファンから1 mgのナイアシンが生合成されているという意味である。数字が小さいほど効率が高いこと意味する。Day 1~Day 3で効率が高いのは、実験開始前には通常食事であるので、ナイアシンそのものを摂取しており、そのために効率は高くでていた。しかし、Day 4からはほぼ一定の値となった。つまり、前歴の食事の影響がなくなり、実験食の結果のみを反映してきたことを意味する。この時のトリプトファン-ナイアシン活性効率は、70 mgのトリブ

トファンが1 mgのナイアシンと当価であるというものであった。第六次で採用されている60 mgのトリプトファンが1 mgのナイアシンと当価であるという値とほぼ同じであった。

5) 母乳中のビタミン含量の測定

乳児の所要量の精度向上のために、母乳中の水溶性ビタミン含量を測定した。

6) 主要な食品中のビオチン含量の測定

ビオチンは、種々の食品に広く分布している。しかし、ビオチンは、五訂日本食品標準成分表には収載されておらず、食品中の含量をはじめとして、食品中での存在状態、調理や加工による変化、生体内における利用率についてなど、ほとんど明らかにされていない。そこで、日常的に摂取している代表的な100食品について、食品中のビオチン含有量を分析し、諸外国の食品中ビオチン量と比較検討した。この結果、食品によって、ビオチン含量や遊離ビオチン率に大きな相違がみられ、生物有効性に差異のある可能性が示唆された。また、鶏卵では、卵黄中の遊離ビオチン率が高値を示し、卵黄がビオチンの供給源として有用な食品であることが示唆された。なお、家禽の卵黄には多量のビオチンが存在したが、魚卵のビオチン濃度は低値であった。これは、加工処理後の残存率が低い可能性もあり、今後検討が必要である。一方、デンマークやカナダの食品成分表には、それぞれ約100種類の食品のビオチン量が示されている。これらのビオチン含量については大きな相違は認められず、わが国においてこれらの食品のビオチン含量も利用が可能である。

7) 動物を使用した許容上限摂取量の算定に関する基礎的実験

過剰毒性を示す実験は、ヒトではできない。そこで、幼若ラットを用いて短期毒性実験を行った。毒性の指標としては、特に、ビタミン代謝のかく乱を重視しておこなった。ビタミンB₁とB₂は飼料中に1%添加しても悪影響は認められなかった。パントテン酸は0.5%の添加までは悪影響は認められなかったが、1%では認められた。ニコチンアミドの許容上限量の評価は、尿中にニコチンアミドN-オキシドの検出が利用できることを明らかにした。

8) ビタミンB₁₂欠乏の影響

ラットを用いて、ビタミンB₁₂欠乏の精

子形成に及ぼす影響を、胎生期から成熟までの発育段階において検討した。ビタミン B₁₂ は精子形成に不可欠であり、とくに、精母細胞の分裂や精子の成熟に関与していることが示唆された。

9) ビタミン定量方法の精度向上に関する研究
アスコルビン酸測定の精度を上げるための研究を行い、成果を得た。

10) ビタミン必要量に影響を与える食品汚染物質の検索とその対策

内分泌攪乱物質の候補に挙げられている物質がビタミンの必要量に及ぼす影響を調べ、成果を上げた。

11) 講演会

11-1) 「第 4 回日本人の水溶性ビタミンの必要量: 元気なカラダとビタミン摂取—水溶性ビタミンの必要量について—」を開催

実施日: 平成 15 年 11 月 22 日 (土) 13 時~17 時

実施場所: 高知女子大学 (高知市)

11-2) 「第 5 回日本人の水溶性ビタミンの必要量: 食品中のビタミンはどれくらい吸収・利用されるのか」を開催

実施日: 平成 16 年 2 月 21 日 (土) 13 時~17 時

実施場所: 財団法人総合交流事業団 京都テルサ (京都市)

12) 第 55 回日本ビタミン学会で「水溶性ビタミンの食事摂取基準」という特別なセッションで 10 題発表

1. 目的と実験方法
2. ビタミン B₁
3. ビタミン B₂
4. ビタミン B₆
5. ビタミン B₁₂
6. ナイアシン
7. パントテン酸
8. 葉酸
9. ビオチン
10. ビタミン C

研究成果の意義及び今後の発展性

第六次改定で示された水溶性ビタミン量を摂取させれば、臨床的に使用されている欠乏の基準値以上の数値を示したことから、欠乏を予防するという観点からみれば、完璧な数値策定であることが判明した。日本にはもはや水溶性ビタミン欠乏はみられず、欠乏症を予防するための数値に関する研究は必要はない。しかしながら、日本食はビタミン B₁ と B₂ の摂取量不足が見られやすいことが判明した。指導が必要で

ある。

生活習慣病を予防するという観点から、水溶性ビタミンの体内の飽和値を求めた。今後、これらの飽和値量のビタミン量摂取時に、生活習慣病と関連性が高い臨床指標がどのような値を示すかを検討し、生活習慣病予防との関係を明確にしていきたい。

利便性の高いサプリメントの普及のため、許容上限摂取量の設定が急務である。動物実験から推定した値の換算係数の決定が必要である。ニコチンアミドで得られた結果のように、過剰になれば、新規な異化代謝産物が検出される方法が最も良い。このためには、ビタミンの異化代謝経路をまず明らかにする研究が必要である。

得られた成果を第 7 次改定日本人の食事摂取基準に利用することができた。

倫理面への配慮

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、本研究所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する。動物実験は、滋賀県立大学における動物実験に関する指針第 5 条に基づき、動物実験委員会に、動物実験計画申請書を提出し、審議を経て許可された後に行った。

発表論文

1. 福渡努, 齊藤智恵, 佐々木隆造, 柴田克己. (2003) ラットにおけるインスタントコーヒーのナイアシン活性. 日本家政学会誌, **54**, 77-82
2. Kimura N, Fukuwatari T, Sasaki R, Hayakawa F, Shibata K. (2003) Vitamin intakes in Japanese college women students. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **49**:149-155.
3. 渡辺敏明, 前田邦彦, 渡辺義孝, 榎原周平, 中野長久. (2003) 雄ラットの発育に伴うビタミン B₁₂ 欠乏状態の精子形成に及ぼす影響. *微量栄養素*, **20**:55-59.
4. Ihara H, Shino Y, Hashizume N, Hirano A, Okada, M. (2003) The assay of ascorbic acid in serum is not affected by physiological concentrations of transferrin and hemoglobin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **49**:289-291.
5. Ihara H, Shino Y, Hashizume N. (2003) Optimum concentration of metaphosphoric acid as the deproteinizing

- reagent for enzymatic analysis of ascorbic acid in serum. *J. Anal. Bio-Sci.*, **26**:365-368
6. 渭原博, 橋詰直孝. (2003) EBM に基づいたビタミン欠乏症の判定. *臨床病理レビュー*, 特集第 127 号, 24-30.
 7. 渭原博, 篠良雄, 松本信明, 橋詰直孝. (2003) 検査室からみた血中ビタミン測定. *臨床検査*, **32**:274-279.
 8. 橋詰直孝, 渭原博, 志越顕, 谷晴仁. (2003) 高カロリー輸液の臨床輸液モデルにおけるビタミン B₁ の安定性. *日本臨床栄養学会雑誌*, **24**:208-211.
 9. Fukuwatari T, Wada H, Sasaki R, Shibata K. (2004) Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide *N*-oxide and nicotinuric acid in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 44-50.
 10. Ohta M, Kitamura J, Fukuwatari T, Sasaki R, Shibata K. (2004) Effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in mice. *Experimental Animals* **53**: 57-60.
 11. 福渡努, 鳥落舞, 佐々木隆造, 柴田克己. (2004) 内分泌攪乱物質候補ビスフェノール A, スチレンモノマーによるトリプトファンニコチンアミド転換経路攪乱作用. *食品衛生学会誌*, **45**: 1-7.
 12. Fukuwatari T, Ohta M, Sugimoto E, Sasaki R, Shibata K. (2004) Effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate, a putative endocrine disrupter, on enzyme activities involved in the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biochim. Biophys. Acta* in press

研究組織

研究者名	分担する研究項目	最終卒業学校・卒業年次・学位及び専攻科目	所属機関及び現在の専門(研究場所)	所属機関における職名
主任研究者 柴田克己	統括, ビタミンB ₁ , B ₂ , B ₆ , ナイアシン, パントテン酸, ビタミンCの必要量	京都大学大学院 昭和54年 農学博士 食品工学	滋賀県立大学 人間文化学部 食品・栄養生化学 (滋賀県立大学)	教授
分担研究者 橋詰直孝	統括補佐 ビタミン測定方法の精度管理	東邦大学医学部 昭和41年 医学博士 医学	東邦大学医学部 臨床検査医学 (東邦大学)	教授
分担研究者 渡邊敏明	ビオチン, ビタミンB ₁₂ , 葉酸の必要量	新潟大学大学院 昭和50年 理学博士 医学博士 理学	姫路工業大学・環境人間学部 (姫路工業大学)	教授
分担研究者 西牟田守	ビタミン必要量 実験の担当医師. 高齢者の血液・尿 試料採取.	東京慈恵会医科大学 昭和50年 医学博士 医学	国立健康・栄養研究所 人体生理学 (国立健康・栄養研究所)	室長
分担研究者 戸谷誠之	泌乳量の調査と 母乳集め.	名古屋市立大学大学院 昭和48年 医学博士 医学	昭和女子大学大学院生活機構研究科 検査医学 (昭和女子大学)	教授

栄養状態の指標

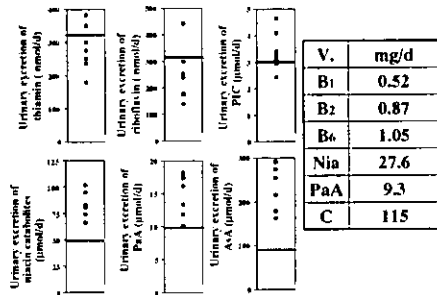
血液	<ul style="list-style-type: none"> ●一定値以上にはならない(体内には飽和量がある)。健康者では一定の値を示す。 ●必要量以下の摂取日が続き、欠乏症が顕在化する直前で、はじめて低下してくる。 ●欠乏の診断には適している。
尿	<ul style="list-style-type: none"> ●摂取量の低下がすぐに反映される。欠乏の予防つまり栄養状態の指標には適している。

図1. 栄養状態の指標

ビタミン栄養状態の対照値

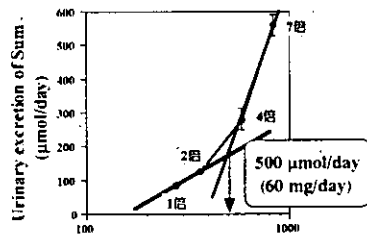
ビタミン名	尿
B ₁	>333nmol/d
B ₂	>319nmol/d
B ₆	>3.0 μmol/d
ナイアシン	>50 μmol/d
パントテン酸	>10 μmol/d
C	>90 μmol/d

図2. ビタミン栄養状態の対照値



女子学生が選択した一定の食事を摂取させた時の尿中の水溶性ビタミン排泄量

図3. 尿中へのビタミン排泄量を指標とした栄養状態の判定の一例

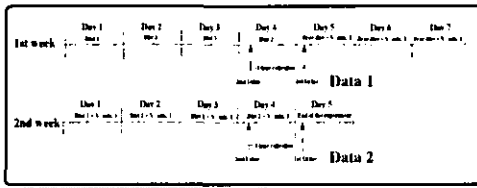


体内の飽和量を求めるための実験

図4. 体内の水溶性ビタミンの飽和量を求めるための実験例ーナイアシンー

ビタミン名	第六次改定の所要量	飽和点	倍数
ビタミンB ₁	0.42 mg/1,000kcal	1.2 mg/1,000kcal	2.9
ビタミンB ₂	0.48 mg/1,000 kcal	2.2 mg/1,000 kcal	4.6
ビタミンB ₆	0.017 mg/g protein	0.066 mg/g protein	3.7
ビタミンB ₁₂	0.0024 mg/day	?	?
ニコチンアミド	6.3 mgNE/1,000 kcal	34.5 mgNE/1,000 kcal	5.5
パントテン酸	5 mg/day	24 mg/day	4.8
葉酸	0.2 mg/day	0.78 mg/day	3.9
ビオチン	0.03 mg/day	0.10 mg/day	3.3
ビタミンC	100 mg/day	190 mg/day	1.9

図5. 体内の飽和量を指標とした時の必要量



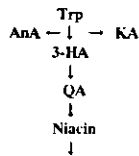
生体利用率(%)の計算方法

$$A = \frac{\text{(Data 2の尿中B1排泄量 - Data 1の尿中B1排泄量)}}{\text{添加した合成B1量}}$$

$$B = \frac{\text{Data 1の尿中B1排泄量}}{\text{食事の中のB1量}} \quad \text{生体利用率(\%)} = (B/A) \times 100$$

図6. 食品中のビタミンの生体利用率を求めるための実験方法

ナイアシンの必要量に関する基礎的研究の結果



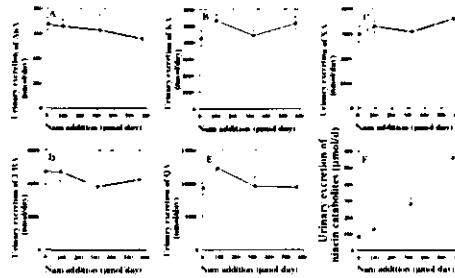
ナイアシンはトリプトファンから生成される

図8. トリプトファン→ナイアシン代謝

食品中のビタミンはどれくらい吸収・利用？
—生体利用率—

ビタミン名	生体利用率
ビタミンB1	66% (42~87)
ビタミンB2	64% (41~90)
ビタミンB6	75% (66~80)
ナイアシン	70% (35~80)
パントテン酸	70% (51~78)

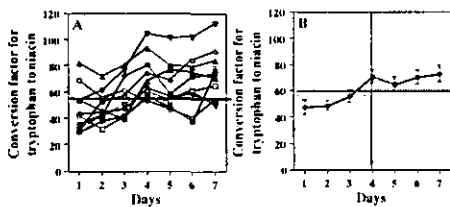
図7. 女子学生が選択する典型的な食事の中のビタミンの生体利用率



ニコチンアミドの付加はde novoニコチンアミド合成経路に影響を与えない

図9. ニコチンアミドde novoニコチンアミド合成系に及ぼす影響

食事摂取基準に従った栄養素を摂取した時の転換率



トリプトファンのナイアシン当量値

図10. トリプトファン→ナイアシン転換効率

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

1. ビタミン B₁

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したビタミン B₁ の測定方法をまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC による尿中のチアミン測定方法

1-1. 試薬作成方法

0.1 M HCl

Hydrochloric Acid = 36.46

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

[Assay 35.0 ~ 37.0%, 比重 1.18]

$1180 \times 36 / 100 = 424.8 \text{ g} \cdots 1\text{L}$ に含まれる塩酸量

$424.8 / 36.5 = 11.6 \text{ mol} / \text{L} \cdots 1\text{L}$ に含まれる

塩酸のモル濃度

HCl を 1ml 取り, 超純水を 115ml 加えてよく混和した。

ビタミン B₁ 標準溶液 (冷蔵保存)

Thiamin Hydrochloride = 337.27

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

1) 1 mg/ml のビタミン B₁ 標準溶液を作成。

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$ を 10 mg 秤量し,
0.1M HCl 10 ml に溶解した。

2) 0.01 mg/ml のビタミン B₁ 標準溶液を作成。

1) を 0.1 ml 取り 0.1M HCl 9.9 ml 加えて
100 倍希釈し, よく混和した。

3) 0.1 M HCl を対照として, 2) の吸光度を測定し, $\epsilon_{246\text{nm}} = 14200$ より正確な濃度を求め, これを標準液とした。(図 1)

移動相

0.2 M NaH₂PO₄

Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate = 156.01

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

$156.01 \times 0.2 \times 1 = 31.202 \text{ g}$

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 31.202 g 秤量し, 超純水 800ml くらいに溶解して, 1L にメスアップし, よく混合した。これを 2 度繰り返し, 2 L 作成した。

反応液

0.01% K₃ [Fe (CN)₆]

Potassium Hexacyanoferrate (III)

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

$\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6] = 329.25$

$500 \times 0.01 / 100 = 0.05 \text{ g}$

$\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ を 0.05 g 秤量して, 500 ml に溶解してよく混合した。

15% NaOH

NaOH = 40.00 (Assay min. 96.0%)

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

$500 \times 15 / 100 = 75.0 \text{ g}$

NaOH を 75 g 秤量してビーカーに入れ, ガラス棒でよく混和しながら, 425 ml の超純水を少しずつ加えて溶解した。(このとき刺激臭と熱を発生するので, ドラフト内で氷水で冷やしながらかつた。)

1-2. 試料調製方法

尿を用いた時のビタミン B₁ 定量用 HPLC 試料調製のための操作方法を図 2 に示した。

1-3. 測定条件

移動相: 0.2M NaH₂PO₄

(L-6000 Pump HITACHI)

流速: 1.0ml/min (PRESSURE: 19kgf/cm²)

反応液 1: 0.01% K₃Fe (CN)₆

(L-7100 Pump HITACHI)

流速: 0.15ml/min

(PRESSURE: 0kgf/cm²)

反応液 2: 15% NaOH

(LC-9A Pump SHIMADZU)

流速: 0.15ml/min

(PRESSURE: 1kgf/cm²)

反応コイル: PEEK チューブ (外径, 1.80 mm ; 内径, 0.50 mm ; 長さ, 1200 mm)。

カラム: Shodex Rs-pak NN-614 (φ6.0×150mm)

カラム温度: 40°C

検出器: RF-550 SHIMADZU

検出方法： 蛍光法
(励起波長 365nm, 蛍光波長 435nm)
他の機器： L-7200 Auto sampler <HITACHI>
C-R8A CHROMATOPAC
<SHIMADZU>
測定装置の概略を図3に示した。

1-4. 計算方法

1) $2.916 \times 10^{-5} \text{ M}$ の Thiamin Hydrochloride を流し、 $20 \mu\text{l}$ インジェクトした。(0.583nmol インジェクトした。)そして、1nmol 当たりの AREA を計算した。〔1200000 前後 / nmol〕 (図4)

2) 試料の検出 AREA / 1nmol 当たりの AREA \times 24 時間尿の全量 (ml) / 0.02 (ml)
= _____ nmol / day

※ 0.02 ml = 試料注入量

例)

1. ラット尿 (図5)

$$590364/12924083 \times 25/0.02 = 57.10 \text{ nmol / day}$$

2. ヒト尿 (図6)

$$107184/12289446 \times 10/9 \times 725/0.02 \\ = 351.3 \text{ nmol / day}$$

※ $10/9 = (\text{尿 } 8.1\text{ml} + \text{HCL } 0.9\text{ml}) / (\text{尿 } 8.1\text{ml})$
サンプル作成時の塩酸処理

2. HPLC による糞中チアミン測定方法

2-1. 試薬作成方法

10%メタリン酸溶液

Metaphosphoric Acid, Lump Assay 37.0%
(as HPO_3) (和光純薬工業株式会社)
40.54 g を超純水に溶かし、150ml にメスアップした。

$$10 \times 100 / 37 \times 150 / 100 = 40.540 \text{ (g)}$$

3%メタリン酸溶液

Metaphosphoric Acid, Lump Assay 37.0%
(as HPO_3) (和光純薬工業株式会社)
16.21 g を超純水に溶かし、200ml にメスアップした。

$$3 \times 100 / 37 \times 200 / 100 = 16.216 \text{ (g)}$$

以下、尿中チアミン測定と同じ試薬を使用した。

2-2. 試料調製方法

糞を用いた時のビタミン B_1 定量用 HPLC 注入試料作成の操作方法を図7に示した。

2-3. 測定条件

尿の測定条件と同様

2-4. 計算方法

1) 標準を流し、1nmol 当たりの AREA を計算した。〔AREA 1200000 前後 / nmol〕

2) 試料の検出 AREA \times 希釈倍数 / 1nmol 当たりの AREA \times 上清量 (ml) / 0.02 (ml) \times 1日の糞量 (g) / 処理に用いた糞量 (g)
= _____ nmol / day

例) ラット糞 (図8)

$$(22373 \times 5) / 12924083 \times 3.2 / 0.02 \times 0.528 / 0.1063 = 6.88 \text{ nmol / day}$$

3. HPLC による肝臓中、血液中のチアミン測定方法

3-1. 試薬作成方法

1.5% EDTA 溶液

2NA (EDTA-2Na) (和光純薬工業株式会社)
 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 372.24$

EDTA-2Na を 0.15g 秤量し 10ml にメスアップして、1.5% EDTA 溶液を作成した。

5%TCA 溶液

Trichloroacetic Acid = 163.39

(和光純薬工業株式会社)

TCA 10.0g を秤量し、超純水を 160ml 加えて溶解し、200ml にメスアップした。

4M 酢酸ナトリウム

Acetic natrium = 136.08

(和光純薬工業株式会社、室温保存)

$$136.08 \times 4 \times 0.05 = 27.216$$

酢酸ナトリウムを 27.216 g 秤量し、超純水 40ml に溶解し、50ml にメスアップした。

タカジアスターゼ B 溶液

タカジアスターゼ B [ビタミン B_1 定量用]
(三共株式会社)

Vitachange, Activated [ビタミン B_1 定量用]
(和光純薬工業株式会社)

1) タカジアスターゼ B を 0.2g 秤量し、超純水 10ml に溶解した。

2) 活性ビタチェンジを 0.2g 秤量し、超純水 10ml に溶解した。

3) 1) を $500 \mu\text{l}$ エッペンに入れ、そこへ 2) を $500 \mu\text{l}$ 加え、1% タカジアスターゼ B 溶液を作成した。(この時 2) は攪拌しながらピペットで採取した。)

4) アルミ箔でまわりを覆い、30 分間振とうした。〔MODEL 2330 WAKENYAKU CO., LTD. 使用〕

5) 遠心分離 (10000rpm, 10min, 4°C) した。

6) 5) の上清をエッペンに移し、この液をピ

タミン B₁ 測定前処理用タカジアスターゼ B 溶液とした。

以下、尿中チアミン測定と同じ試薬を使用

3-2. 試料調製方法

生体試料を用いた時のビタミン B₁ 定量用 HPLC 注入試料作成の操作方法を図 9 に示した。

3-3. 測定条件

尿の測定条件と同様

3-4. 計算方法

血液中

1) 標準を流し、1nmol 当たりの AREA を計算した。[1200000 前後 / nmol]

2) 試料の検出 AREA / 1nmol 当たりの AREA × 250 / 20 × 600 / 200 × 1000 / 200 = _____ nmol/ml

※250 μl・・・上清 200 μl + 4 M 酢酸 Na 30 μl + 1% タカジアスターゼ B 溶液 20 μl
20 μl・・・インジェクション量
600 μl / 200 μl・・・血液 200 μl + 5% TCA 400 μl のうちの上清 200 μl
1000 / 200 μl・・・血液 1ml に換算

例) ラット血液 (図 10)

$$52042/12531343 \times 250/20 \times 600/200 \times 1000/200 = 0.78 \text{ nmol / ml blood}$$

肝臓中

1) 標準を流し、1nmol 当たりの AREA を計算した。[1200000 前後 / nmol]

2) 試料の検出 AREA / 1nmol 当たりの AREA × 250 / 20 × 5150 / 200 × 1.0 / 0.5 = _____ nmol / g of liver

3) _____ nmol / g of liver × 肝臓重量 g = _____ nmol / liver

※5150 μl・・・肝臓 0.5g + 5% TCA 5.0ml のホモジネート ≒ 5.15 ml (5150 μl)
200 μl・・・上清
1.0 / 0.5g・・・肝臓 1g に換算

例) ラット肝臓 (図 11)

$$668173/12531343 \times 250/20 \times 5150/200 \times 1.0/0.5 = 34.32 \text{ nmol / g of liver}$$

4. HPLC による食品中のビタミン B₁ 測定方法

4-1. 試薬作成方法

80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)
(冷蔵保存)

Acetic Acid 99.7% (和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

1) 4M 酢酸ナトリウム 20 ml を 800 ml の超純水に溶解させ、酢酸を約 5 ml 加えて pH 4.5 に合わせた。

2) 1) に超純水を加え、1 L に定容した。

2.5% タカジアスターゼ B 溶液 (遮光, 用事調製)

タカジアスターゼ B [ビタミン B₁ 定量用] (三共株式会社)

褐色瓶にタカジアスターゼ B を 2.5 g 秤量し、97.5 ml の 80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 [pH 4.5] に溶解させた。

以下、尿中チアミン測定と同じ試薬を使用

4-2. 試料調製方法

食品を用いた時のビタミン B₁ 定量用 HPLC 注入試料作成の操作方法を図 12 に示した。

4-3. 測定条件

尿の測定条件と同様

4-4. 計算方法

1) 標準を流し、1nmol 当たりの AREA を計算した。[1200000 前後 / nmol]

2) 試料の検出 AREA / (標準 1nmol 当たりの AREA) × 50 ml / 0.02 ml × (試料の全量) / (秤量した試料の重さ) = _____ a nmol / 食事 1 食分

_____ a × 337.27 × 10⁻⁶ = _____ mg / 食事 1 食分
※50 ml = 全量, 0.02 ml = 注入量,
337.27 = チアミン塩酸塩の分子量

例) 食事中

$$42200/12623907 \times 50/0.02 \times 428.34/3.1306 = 1143.46 \text{ nmol / 食事 1 食分}$$

$$1143.46 \times 337.27 \times 10^{-6} = 0.386 \text{ mg / 食事 1 食分}$$

B. 健康危険情報

特記する情報はない。

C. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 口頭発表

なし

D. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし
3. その他
なし

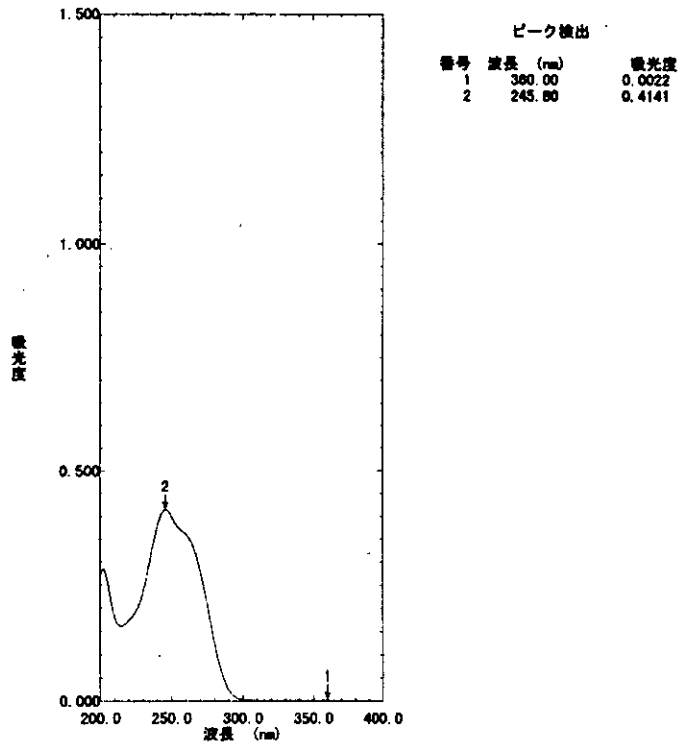


図1. チアミンの UV スペクトラム

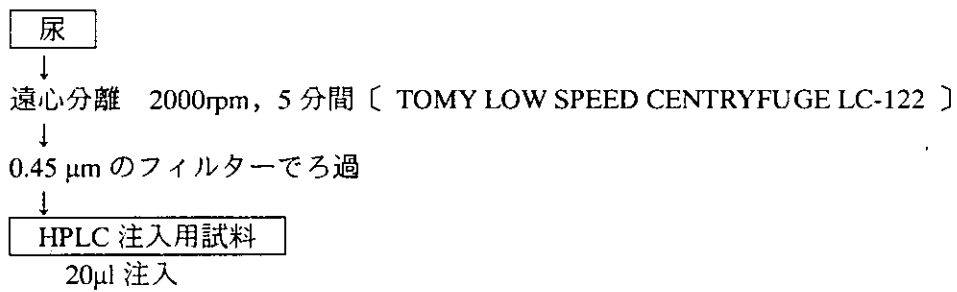


図2. 尿中チアミン測定のための HPLC 用試料の調整方法

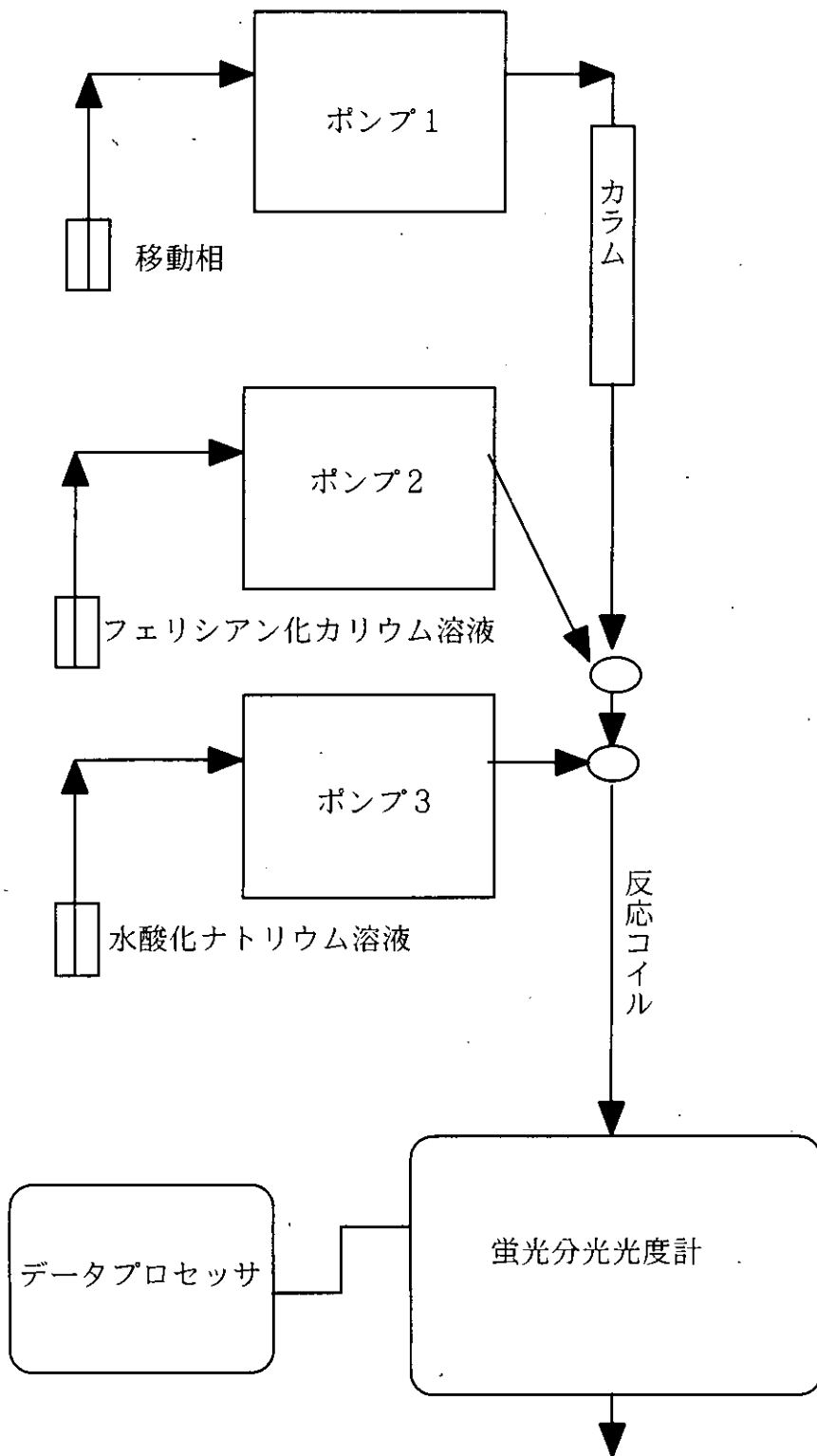
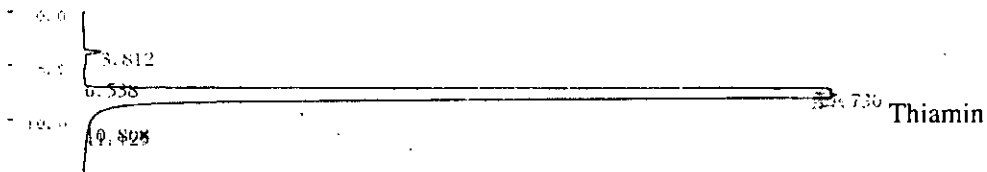


図3. ビタミン B₁ 定量用 HPLC の概略図

Thiamin Hydrochloride Standard



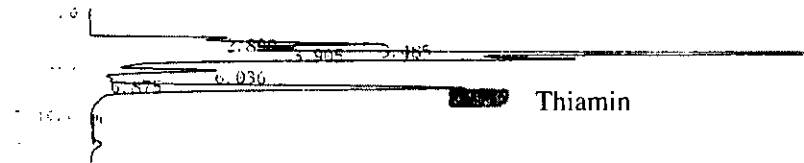
C-6SA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=6 DATA=1:*CHRM1.C05 03-10-22 19:15:38

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	3.812	12232	747			0.1629	
	3	19.837	495388	224663	SV		99.8371	
TOTAL			7507620	225410			100	

図4. チアミン塩酸塩標準の HPLC クロマトグラム の例

C-6SA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:*CHRM1.C06 ATEN 5 SPEED 2.0

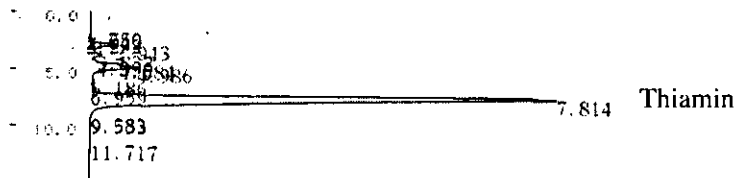


C-6SA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=7 DATA=1:*CHRM1.C06 03-10-22 20:02:16

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.89	126746	6097			4.2635	
	2	3.485	335909	13016	V		11.2993	
	3	3.905	171948	8992	V		5.781	
	4	4.363	907593	50665	V		30.5296	
	5	4.914	644650	22062	V		21.6847	
	6	6.036	146748	5596	V		4.9363	
	7	6.875	25334	936	V		0.8522	
	8	19.837	495388	16535	SV		19.8587	
	12	11.567	1187	69	V		0.0399	
	13	11.742	1585	74	V		0.0533	
	14	13.157	20766	434			0.6985	
TOTAL			2972829	124476			100	

図5. 尿 (ラット) を試料としたときの HPLC のクロマトグラム の例



C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=8 DATA=1:CHRM1.C00 04/01/06 21:51:28

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4	2.943	26242	1098	V		3.44	
	5	3.832	10887	459	V		1.4271	
	6	4.39	3962	285	V		0.5194	
	7	4.684	16648	1272	V		2.1824	
	8	4.986	47552	1947	V		6.2334	
	9	6.186	4227	166	V		0.554	
	10	6.959	6211	221	V		0.8142	
	11	7.814	647128	18826	SV		84.8296	
TOTAL			762856	24274			100	

図6. 尿（ヒト）を試料としたときのHPLCのクロマトグラムの例

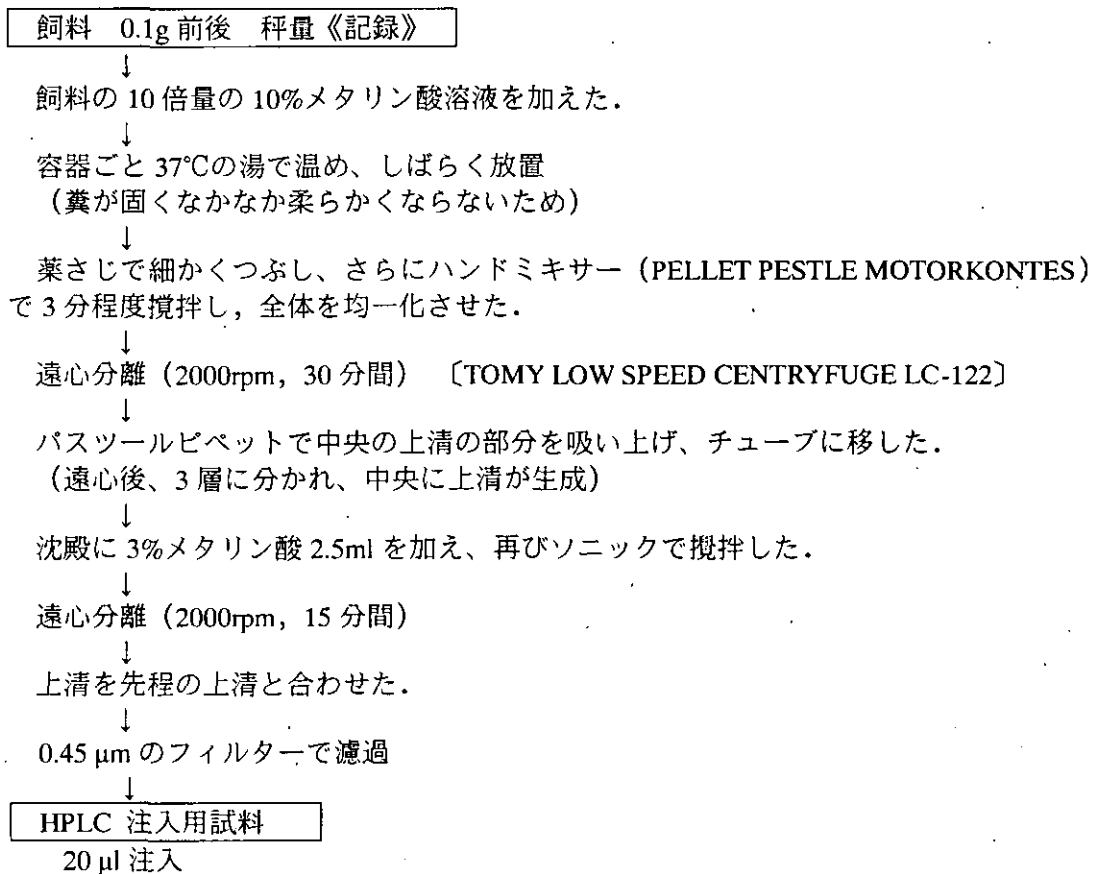
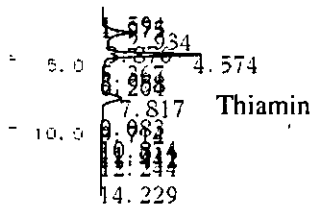


図7. 糞中チアミン測定のためのHPLC用試料の調整方法



C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=4 DATA=1:CHRMI.C00 04/01/06 20:42:54

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	2.934	29793	981			25.4127	
	4	3.876	5037	193	V		4.2961	
	5	4.574	60034	3371	SV		51.2078	
	9	7.817	22373	663			19.0835	
TOTAL			117235	5208			100	

図8 . 糞を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

〈サンプル前処理〉

血液 1.5% EDTA 溶液を 25 μ l ねじロチューブに採取し、エバポレーターであらかじめ乾固させておいた。そこへ血液 200 μ l を採取し、タッチミキサーで混合して、さらに 5% TCA を 400 μ l 加えよく混合した。(水中保存)
10000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清をエッペンに移した。

肝臓 肝臓を 0.5 g 程度切り取り、10 倍量の 5% TCA (約 5ml) 加えてホモゲナイズした。
10000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清をエッペンに移した。
〈遠心分離：微量高速冷却遠心機 MX-300 TOMY 使用〉

使用するまで -80°C で保存した。

サンプル作成

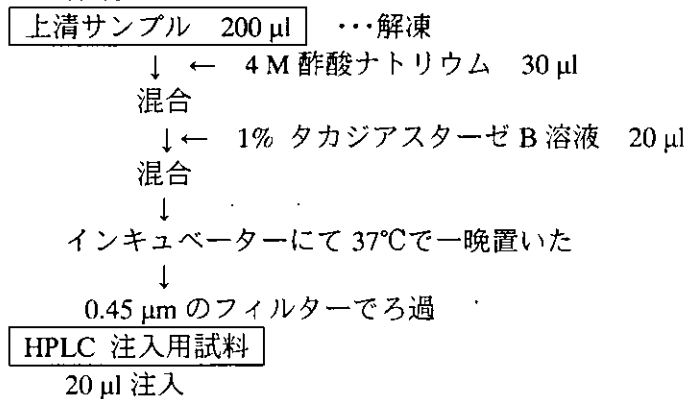
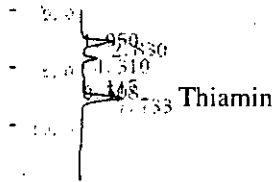


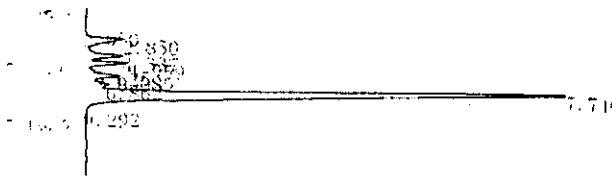
図9 . 血液中・肝臓中チアミン測定のための HPLC 用試料の調整方法



** CALCULATION REPORT **

CH PRNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.83	35347	1226			31.935	
	4.31	11567	580			11.1517	
	6.117	2224	84	S		2.1981	
	7.733	52042	1566			51.4352	
TOTAL		101180	3462			100	

図 10. 血液を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例



** CALCULATION REPORT **

CH PRNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.85	51409	1527	V		5.9384	
	4.357	41837	1539	V		1.8327	
	4.959	35559	1735	V		4.1074	
	5.625	6632	384	V		0.766	
	6.089	36139	1319	V		1.1715	
	6.862	25968	874	V		2.9996	
	7.746	66817.3	19376	SV		77.1815	
TOTAL		865717	26753			100	

図 11. 肝臓を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例