

平成16年度厚生労働科学研究費補助金
循環器疾患等総合研究事業

日本人の食事摂取基準(栄養所要量)の策定に関する研究
平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柴田 克己

平成17(2005)年4月

目次

I. 総括研究報告書	
1. 平成 16 年度の成果の要約	001
柴田克己	
II. 主任研究者の報告書	
1. ヒト血清中の葉酸値とビタミン B ₁₂ 含量の男女差に関する研究	016
柴田克己	
2. ヒト全血中のビタミン B ₁ , ビタミン B ₂ 及び NAD 含量, 並びに血清ビタミン C 含量に関する研究	022
柴田克己	
3. ビタミンの上限量の検討—葉酸—	032
柴田克己	
4. ビタミンの上限量の検討—内因性ニコチンアミド—	043
柴田克己	
5. カツオ由来ナイアシン高濃度含有パウダーのナイアシンとしての生物有効性	061
柴田克己	
6. 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファン—ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位	075
柴田克己	
7. ヒト, ラット, マウスにおけるトリプトファン—ニコチンアミド代謝の比較	090
柴田克己	
8. 魚類における 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ/アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性比からのトリプトファン—ニコチンアミド変換率の推定	098
柴田克己	
9. 宇宙環境がラットの補酵素 NAD に及ぼす影響	103
柴田克己	
10. トリプトファン—ナイアシン代謝に関与する酵素活性から推定したラット乳仔のトリプトファン—ナイアシン転換率	114
柴田克己	
11. 加齢に伴うビタミン代謝に関する研究—ラットにおける影響—	118
柴田克己	
12. ラットにおける高タンパク質食投与時のナイアシンの必要性	125
柴田克己	
13. 幼児の尿中ビタミン排泄量	146
柴田克己	
III. 分担研究者の報告書	
1. トリプトファン—NAD 変換系の分子生物学的解析	152
福岡伸一	
2. 水溶性ビタミンの測定方法の検討—ビタミン B ₆ —	160
早川享志	
3. 高たんぱく質食摂取下における若齢および成熟ラットのビタミン B ₆ 栄養について	167
早川享志	
4. ビタミン B ₁₂ の栄養評価に関する基礎的研究	176
渡辺文雄	
5. わが国の食品に含まれるビオチン量の分析	199
渡辺敏明	
6. 葉酸の体内動態の評価についての基礎的研究	215
渡辺敏明	
7. 乳児におけるビオチンの栄養状態に関する検討	228
渡辺敏明	

8.	健常成人における葉酸の必要量についての検討	240
	渡辺敏明	
9.	日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討	251
	渡辺敏明	
10.	ビタミンCと葉酸の必要量に関する検討—ビタミンC, 葉酸—	263
	梅垣敬三	
11.	血中及び母乳中脂溶性ビタミン濃度の定量法の開発	271
	岡野登志夫	
12.	カロテノイドの必要量	283
	寺尾純二	
13.	ビタミンE測定法に関する検討	289
	玉井浩	
14.	ビタミンE (α -トコフェロール) 栄養状態の加齢に伴う変化と食物アレルギーに対する作用	293
	森口覚	
15.	炎症性腸疾患患者における脂溶性ビタミン (ビタミンD, ビタミンK) の吸収阻害及びその骨粗鬆症との関連に関する検討	310
	田中清	
16.	文献レビューに基づく食事摂取基準の策定	321
	佐々木敏	
IV.	研究協力者の報告書	
1.	中高年のビタミン摂取量と生活習慣病	338
	廣瀬潤子	
2.	ヒト尿中のビタミン排泄量に関する研究	346
	廣瀬潤子	
3.	糖尿病患者に対するエネルギー制限食における水溶性ビタミン摂取量の検討	356
	福井富穂	
V.	講演会の開催報告書	
1.	日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) の策定に関する研究—第1回講演会— 日本人の食事摂取基準 (2005年版)	370
	柴田克己	
2.	日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) の策定に関する研究—第2回講演会— ビタミン—Health & Beauty—	388
	柴田克己	
VI.	研究成果の刊行に関する一覧表	411
VII.	研究成果の刊行物・別刷	415

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
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 16 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離乳前乳児の哺乳量に関する研究，②母乳中のビタミン含量の測定，③ビタミンの定量方法の開発，④新規なビタミン栄養指標の検索，⑤ビタミンと高齢者，⑥水溶性ビタミンの体内飽和量を維持する量を摂取し続けた時の生活習慣病と連関する生化学的パラメータの変動，⑦乳児から外挿した値と成人から外挿した値が乖離するビタミン B₆ の必要量—若齢期と成熟期の比較，⑧糖尿病とビタミン，⑨食品中の真のビタミン B₁₂ 含量について，などの実験をおこない，2010 年に予定されている「日本人の食事摂取基準」の策定に必要な科学的根拠のデータを蓄積しつつある。なお，本研究は 3 年計画の 1 年目である。

1) 離乳前乳児の哺乳量に関する研究 (図1)

乳児の食事摂取基準の算定の基本は、「母乳を適当量摂取している限り、健常に発育する。」という考え方である。ところが、日本人の哺乳量のデータ、栄養素の含量のデータはきわめて乏しいものであることが判明した。そこで、哺乳量の調査を開始した。3年計画の1年目は哺乳量の調査を行い、0.78L/日というデータを得た。引き続き、調査を行う。

2) 母乳中のビタミン含量の測定 (図1)

日本人の食事摂取基準(2005年版)で策定した34の栄養素含量に関する調査を開始した。3年計画の1年目に相当する平成16年度は、定量方法がすでに確立している水溶性ビタミンに関して分析を行った。わが国の健常授乳婦人から得た母乳のビオチン、パントテン酸およびナイアシンの含量を分析した。母乳の採取は、授乳後21-89日間および90-180日間で夏季と冬季に採取した。これまでに報告されている値と比較して、母乳のビオチン含量は低値、パントテン酸の含量は約2倍、ナイアシンの含量は、とくに差異は観察されなかった。今後さらに分析をし、データを蓄積していく予定である。引き続き、調査を行う。

3) ビタミンの定量方法の開発 (図2)

日本人のビタミンD、ビタミンK食事摂取基準策定のための科学的根拠となる血中ビタミンD・K濃度と関連栄養指標の基準値(参照値)を各年齢区分において求めるために、平成16年度ではその基礎となる血中ビタミンD代謝物およびビタミンK同族体の測定法の確立に主眼を置き、研究を行なった。その結果、①重水素標識化ビタミンD代謝物を合成し、これを用いた高精度なLC/MS/MS測定法を確立した。また、本法と現在汎用されている免疫定量法とを比較し、精度・感度面で優れていることを確認した。②重酸素標識化ビタミンK同族体を合成し、これを用いた高精度なLC/MS/MS測定法を確立した。また、本法と現在汎用されている蛍光HPLC定量法とを比較し、精度・感度面で優れていることを確認した。③合成内部標準物質を用いる食品中ビタミンK同族体の高精度蛍光HPLC定量法を確立し、日本食品標準成分表にビタミンK含有量が記載されている全ての食品について再測定を行なった。④脂溶性ビタミン(ビタミンA、D、E、K、 β -カロテン)の重水素または重酸素標識体をほぼ合成(ビタミンDは最終工程)し、母乳および血中濃度の一斉分析法を開発中である。この方法を用いて、次年度の平成17年度で個人の脂溶性

ビタミン栄養状態を総合的に把握する予定である。⑤カロテノイドの必要量を明らかにすることを目的として本年度は血清・組織のカロテノイド分析法の確立や生体へのカロテノイド分布特性の検討を行い、次年度から実施するヒトボランティア試験のための準備とした。⑥細菌が産生するATPを利用して、ビオチンのより感度の高い微生物学的定量法(ATP法)を確立した。ATP法と従来から用いられてきた比濁法との関係の回帰直線は $y=1.88x-0.32$ で、相関係数は $r=0.73$ ($p<0.01$)と有意な正の相関がみられた。なお、本ATP法は、検出限界が50pg/mlと、従来の濁度法と比べ、高感度である。測定範囲は50pg/ml~800pg/ml、添加回収率は94.1%、同時再現性は8%であった。⑦結合型パントテン酸の遊離型パントテン酸への転換方法を検討し、臓器中の総パントテン酸を測定するには、自己消化法が最も安定した方法であることを明らかにした。⑧ビタミンB₁のポストカラム定量方法を改良した。改良点は、従来は反応液であるNaOHとフェリシアン化カリウムの混合液を送付していたが、再現性が低かったので、フェリシン化カリウム溶液を送付した後、NaOH溶液を送付することで、再現性の高い方法に改良することができた。

4) 新規なビタミン栄養指標の検索 (図3)

①3-ヒドロキシイソ吉草酸(3-HIA)の分析結果を図3示した。ビオチン欠乏患者の尿には3-HIAが検出されているのに対し、ビオチン投与後の尿から3-HIAは検出されなかった。動物実験においても、ビオチンが低下すると3-HIAの増加が認められた。このことから3-HIAがビオチン欠乏の有用な指標であることを明らかにした。②ビタミンB₁₂の栄養状態の新しいバイオマーカーとして赤血球中のビタミンB₁₂依存酵素(メチルマロニルCoAムターゼとメチオニンシンターゼ)活性が利用できるかどうかを検討するために放射性基質を用いない高感度な両酵素活性の測定法を検討した。その結果、HPLCを用いて放射性基質を用いた従来法よりも高感度で両酵素活性を測定することができた。次年度の平成17年度は、ビタミンB₁₂給与および無給与の欠乏ラットを用いてビタミンB₁₂の栄養状態と赤血球中の両酵素活性の関係について検討する予定である。

5) ビタミンと高齢者 (図4)

①健常高齢者の血漿ビタミン E 栄養状態に関する研究: 65 歳以上の健常高齢者では血漿 α -トコフェロール濃度の低下はほとんどみられず、むしろ 20 歳代の若者と比べ若干高い値を示す者さえみられた。しかし、実際は α -トコフェロールが血中に存在する際には VLDL-コレステロール内にあり、しかも、高齢者ではコレステロール、中性脂肪の血中レベルが上昇する者が多いことから、高齢者のビタミン E 栄養状態を判断する場合にはこれら脂質の変動も考慮する必要があることを明らかにした。

②健常高齢者の血漿ビタミン E 濃度と細胞性免疫能: 末梢血 T 細胞機能は 20 歳代の若者と比べ明らかに高齢者では低下していることを明らかにした。さらに、65 歳以上の高齢者においても年齢の上昇に伴い T 細胞機能が低下することを認めた。血漿 α -トコフェロール濃度と末梢血 T 細胞機能との関連をみた場合、有意な相関はみられなかった。しかし、血漿 α -トコフェロール濃度を血漿 VLDL-コレステロール濃度で除したものと末梢血 T 細胞機能との関連をみた場合には有意な正相関を認めた。これら結果から、高齢者の健康保持・増進を図るうえで十分な α -トコフェロールの摂取が望ましいことが明らかとなった。

③食物アレルギーの発症・進展とビタミン E: 卵白アルブミン誘発食物アレルギーモデルマウスを用いて、アレルギーの発症・進展に対する α -トコフェロール投与効果について検討した。その結果、 α -トコフェロール摂取により血中ヒスタミン濃度やロイコトリエン濃度が対照に比べ低いことを見出した。この機序として、血清総 IgE 濃度や卵白アルブミン特異的血清 IgE 濃度が α -トコフェロール摂取により著明に低下することを見出した。その他、Th1 および Th2 サイトカインのバランス異常 (Th1 優位) や B 細胞マイトジェンに対する反応性の低下との関連を認めた。以上の結果から、 α -トコフェロールは免疫賦活作用だけでなく、アレルギーなどの免疫系が異常に亢進した場合にはそれを正常化する作用を有していることを見出した。

④ビタミン B₁₂ と高齢者: 加齢による胃の機能低下などによる胃酸分泌の減少により 50 歳ぐらいから食品に含まれるビタミン B₁₂ が消化・吸収でき難くなる「いわゆる食品タンパク質結合ビタミン B₁₂ 吸収障害」が生じることが高齢者のビタミン B₁₂ 欠乏性神経障害の主因であると報告されている。そこで、人工胃液・腸液を用いた人工消化系を用いて胃酸分泌低下条件

下でも吸収されやすいビタミン B₁₂ を含む食品の評価系を構築することで高齢者用の吸収されやすいビタミン B₁₂ を含む食品を検索した。その結果、鮭腎臓の塩辛めふんに多量に含まれるビタミン B₁₂ のほとんどが遊離型のビタミン B₁₂ であり、胃酸分泌低下条件下でも十分に吸収されることが示唆された。

6) 水溶性ビタミンの体内飽和量を維持する量を摂取し続けた時の生活習慣病と関連する生化学的パラメータの変動 (図5)

平成 15 年度 (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~平成 15 年度の厚生労働科学研究費補助金) で明らかにした、水溶性ビタミンの体内飽和量を維持する量を長期間 (約 20 年間) 摂取し続けた時の生活習慣病などと関連する生化学的パラメータの変動を追跡する実験を開始した。高齢者においては、神経疾患による認知障害が社会問題となりつつある。その中には、B 群ビタミンの高投与により、改善された例も報告されている。予防には高投与は必要ではなく、常に体内を飽和させる最低量の摂取が肝要と考えられる。今後、より神経を疲労させる社会 (映像社会) となることが予測されるため、脳を守る食品の開発は重要である。

7) 乳児から外挿した値と成人から外挿した値が乖離するビタミン B₆ の必要量 - 若齢期と成熟期の比較 (図6)

6~11 か月乳児のビタミン B₆ の食事摂取基準の外挿値が 0~5 か月乳児における母乳に基づく外挿値と成人からの外挿値とは大きく異なる。その原因の 1 つは、成長の著しい時期とそうでない時期におけるビタミン B₆ 必要量に差があるためではないかと考え実験を行った。その結果、血漿ビタミン B₆ レベルは成熟ラットよりも若齢ラットの方が高い傾向にあった。一方、尿中総ビタミン B₆ は、若齢ラットでは成熟ラットよりも低い傾向があった。従って、同じたんぱく質摂取レベル下においては、若齢時では、成熟時よりもビタミン B₆ 必要量は低い可能性があることをラットで明らかにした。

8) 糖尿病とビタミン C (図7)

①食品中ならびに生体試料中の分析方法の検討: 食品として野菜、生体試料として血漿や血球成分を利用して行った。その結果、電気化学検出-HPLC法がいずれに試料中のビタミン C も簡便で高感度に測定で

きる方法であることを明らかにした。②生体のビタミンCレベルの評価を行うとき、血漿ビタミンCと白血球ビタミンC等を比較し、いずれもビタミンCレベルが評価できるマーカーとなるが、通常の条件では血漿が容易な評価マーカーであることを明らかにした。しかし、糖尿病患者のように酸化ストレスを受けるような場合には、白血球ビタミンC濃度が病気の状態と関連していることが明らかになった。

9) 食品中の真のビタミンB₁₂含量について

食品中のビタミンB₁₂の特性と栄養評価を検討した。五訂日本食品標準成分表では、食品中のビタミンB₁₂含量は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を用いたバイオアッセイで測定されているが、本定量菌はビタミンB₁₂以外の物質（デオキシリボースなど：いわゆるアルカリ耐性因子）やヒトが生理的に不活性なコリノイド化合物にも応答するため正確なビタミンB₁₂含量を測定していない可能性がある。そこで、各種食品からコリノイド化合物を単離・同定した。食事調査より日本人は卵類、乳類、魚介類、藻類などがビタミンB₁₂のよい供給源であることから、まず、食用藻類に含まれるコリノイド化合物を単離・同定した結果、栄養補助食品として流通しているスピルリナ錠剤はヒトに不活性なシュードビタミンB₁₂を多量に含んでいたが、その他のものは真のビタミンB₁₂であることを明らかにした。また、一部のお茶（特に製造工程に微生物が関与する後発酵茶）にもかなりの量の真のビタミンB₁₂が含まれていた。ビタミンB₁₂は動物性食品に含まれており、植物性食品には含まれていないと考えられていたが、今回の研究結果から一部の食用藻類やお茶には真のビタミンB₁₂が含まれていることが明らかとなった。一方、昔からタケノコにビタミンB₁₂が豊富に含まれていると言われていたが、そのすべてがアルカリ耐性因子によるものでビタミンB₁₂は含まれていないことを明らかにした。また、東南アジア諸国では魚醤に含まれるビタミンB₁₂がビタミンB₁₂のよい供給源であると考えられていたが、ほとんどの魚醤にはヒトに不活性な未同定なコリノイド化合物が多量に含まれていることを明らかにした。また、日本食品標準成分表に記載されている食品のなかで、最もビタミンB₁₂含量が高い食品が鮭腎臓の塩辛めふん（327.6 μg/100 g）で1 g以下の摂取で成人の推奨量を満たすことができることになる。そこで、めふんに含まれるコリノイド化合物を単離・同定した結果、真のビタミンB₁₂

であることを明らかにした。

10) 講演会

10-1)「日本人の食事摂取基準(2005年版)」
実施日：平成16年10月16日（土）15時～18時

実施場所：滋賀県立大学交流センター（滋賀県彦根市）

10-2)「ビタミンーHealth & Beauty」

実施日：平成16年12月5日（日）13時～17時

実施場所：滋賀県立大学交流センター（滋賀県彦根市）

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

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻	頁	出版年
柴田克己	水溶性ビタミン	臨床栄養	105	856-860	2004
渡邊敏明, 谷口歩美, 福井徹, 太田万理, 福渡努, 米久保明得, 西牟田守, 柴田克己	日本人女性の母乳中ピオチン, パントテン酸およびナイアシンの含量	ビタミン	78	399-407	2004
柴田克己	水溶性ビタミン	静脈経腸栄養	19	29-33	2004
Fukuwatari T, Ohsaki S, Fukuoka S, Sasaki R, & Shibata K	Phthalate esters enhance quinolinic acid production by inhibiting α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase (ACMSD), a key enzyme of the tryptophan pathway.	Toxicol. Sci.	81	302-308	2004
福渡努, 真藤こず恵, 太田万理, 佐々木隆造, 柴田克己	魚類における3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ/アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性比からのトリプトファン-ニコチンアミド変換率の推定	ビタミン	78	409-411	2004
Fukuwatari T, Ohta M, Sugimoto E, Sasaki R, & Shibata K	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	1672	67-75	2004
Fukuwatari T, Honda N, Sasaki R, & Shibata K	Establishment of niacin-deficient mice.	J. Creative Approach for Health	3	19-25	2004

伊藤康宏, 米倉麗子, 齊藤邦明, 柴田克己, 内藤純子, 中上寧, 長村洋一	運動とトリプトファン代謝 - 血中動態からの推測 -	健康創造研究会誌	3	13-18	2004
Takahashi Y, Tanaka A, Nakamura T, Fukuwatari T, Shibata K, Shimada N, Ebihara I, & Koide H	Nicotinamide suppresses hyperphosphatemia in hemodialysis patients.	Kidney International	65	1099-1104	2004
福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己	代謝攪乱物質ビスフェノールAのトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱部位	食品衛生学会誌	45	231-238	2004
Kimura N, Fukuwatari T, Sasaki R, & Shibata K	The necessity of niacin in rats fed on a high protein diet.	Biosci. Biotechnol. Biochem.	69	273-279	2005
Ihara H, Shino Y, & Hashizume N	Recommended dietary allowance for vitamin C in the United State is also applicable to a population of young Japanese women.	J. Clin. Lab. Anal.	18	305-308	2004
鈴木久美子, 佐々木晶子, 新澤佳世, 戸谷誠之	離乳前乳児の哺乳量に関する研究	栄養学雑誌	62	369-372	2004
Okubo H, & Sasaki S	Underreporting of energy intake among Japanese women aged 18-20 years and its association with reported nutrient and food group intakes.	Pub. Health Nutr.	7	911-917	2004

渡邊敏明	外挿法—エビデンスの乏しい性・年齢階級への対応—	臨床栄養	105	718-724	2004
渡邊敏明, 大口憲一, 榎原周平, 福井徹	ビオチン欠乏状態の指標としての尿中3-ヒドロキシイソ吉草酸の高速液体クロマトグラフィによる測定法の検討	生物試料分析	27	309-312	2004
奥田涼子, 谷口歩美, 榎原周平, 福井徹, 渡邊敏明	ATPを指標としたビオチンの微生物学的定量法の検討	Trace Nutrients Research	21	141-147	2004
渡邊敏明 大串美沙, 福井徹	わが国の実年者におけるビオチンの体内動態についての検討	生物試料分析	27	403-408	2004
Watanabe T, Oguchi K, Ebara S, & Fukui T	Measurement of 3-hydroxyisovaleric acid in urine of biotin-deficient infants and mice by HPLC.	J. Nutr.	135	615-618	2005
Suhara Y, Kamao M, Tsugawa N, & Okano T	Method for the determination of vitamin K homologues in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry	Anal. Chem.	77	757-763	2005
Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, & Okano T	Determination of plasma vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using vitamin K analogs as internal standards.	J. Chromatogr. B	816	41-48	2005

Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, & Okano T	Method for the determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry	Anal. Chem.		In press	2005
Yamada H, Waki M, Yamada K, & Umegaki K	Lymphocyte and plasma vitamin C levels in type 2 diabetic patients with and without diabetes complications.	Diabetes Care	27	2491-2492	2004
兼安真弓, 吉村寛 幸, 森口覚	オボアルブミン誘発食物ア レルギー発症に対する高ビ タミンE食投与の影響	ビタミンE 研究の進歩 XI, ビタミンE 研究会編		201-206	2004
Moriguchi S, Yamashita S, & Shimizu E	Nitrients to stimulate cellular immunity: Role in cancer prevention and therapy.	Functional & Nutraceuticals in Cancer Prevention. Ronals R. Watson		87-104	2004
森口覚, 兼安真 弓, 山崎あかね	ビタミンと免疫	J・JSMUFF	No.6	331-335	2004
Kittaka-Katsura H, Ebara S, Watanabe F, & Nakano Y	Characterization of corrinoid compounds from a Japanese black tea (Batabata-cha) fermented by bacteria.	J. Agric. Food Chem.	52	909-911	2004
谷岡由梨, 宮本恵 美, 渡辺文雄	Euglena gracilis Z の生育に伴 うビタミンB ₁₂ 依存性メチオ ニン合成酵素活性の変動	高知女子大 学紀要	54	17-21	2005

Miyamoto E, Watanabe F, Yamaguchi Y, Takenaka H, & Nakano Y	Purification and characterization of methylmalonyl-CoA mutase from a photosynthetic coccolithophorid alga, <i>Pleurochrysis carterae</i> .	Comp. Biochem. Biophys.	138	163-167	2004
Watanabe F, Michihara T, Takenaka S, Kittaka-Katsura H, Enomoto T, Miyamoto E, & Adachi S	Purification and characterization of corrinoid compounds from a Japanese fish sauce.	J. Liq. Chromatogr. Related Technol.	27	2113-2119	2004
伊佐保香, 垣内明 子, 早川享志, 佐々木晶子, 新澤 佳代, 鈴木久美 子, 戸谷誠之, 柘 植治人	日本人の母乳中ビタミン B ₆ 含量	ビタミン	78	437-440	2004

研究組織

①研究者名	②分担する 研究項目	③最終卒業学校・卒業年次・学位 及び専攻科目	④所属機関及び現在の専門 (研究実施場所)	⑤所属機関に おける職名
柴田克己	統括。水溶性 ビタミンリー ダ ビタミンB ₁ , ビタミンB ₂ , ナイアシン, パントテン酸 の必要量	京都大学・院 昭和54年 農学博士 食品工学	滋賀県立大学 食品・栄養生化学	教授
佐々木敏	副統括。文献 レビュー	ルン大学・院 平成6年 医学博士 医学	国立健康・栄養研究所 疫学 (栄養学)	栄養所要量 策的企画・ 運営担当リ ーダ

岡野登志夫	脂溶性ビタミンリーダ、ビタミンDおよびKの必要量	大阪大学・院 昭和49年 薬学博士 薬学	神戸薬科大学薬学部 栄養生化学	教授
福岡伸一	結合型ビタミンの定量的遊離化法の開発	京都大学・院 昭和62年 農学博士 食品工学	青山学院大学 分子栄養学	教授
玉井浩	ビタミンAとEの必要量	大阪医科大学・院 昭和60年 医学博士 医学	大阪医科大学 小児科学	教授
田中清	ビタミンDとKの必要量	京都大学・院 昭和59年 医学博士 医学	京都女子大学 病態栄養学	教授
森口 覚	ビタミンEの必要量	徳島大学・院 昭和58年 保健学博士 栄養学	山口県立大学 公衆栄養学	教授
寺尾純二	カロテノイドの必要量	京都大学・院 昭和50年 農学博士 食品工学	徳島大学 食品化学	教授
梅垣敬三	葉酸、ビタミンCの必要量	静岡薬科大学・院 昭和60年 薬学博士 薬理学	国立健康・栄養研究所 栄養学 食品衛生学	室長
早川享志	ビタミンB ₆ の必要量	京都大学・院 昭和60年 農学博士 食品工学	岐阜大学 食品栄養学	教授
渡邊敏明	ビオチン、葉酸の必要量	新潟大学・院 昭和50年 医学博士・理学博士 理学	兵庫県立大学 公衆栄養学	教授

渡邊文雄	ビタミンB ₁₂ の 必要量	大阪府立大学・院 昭和62年 農学博士 農芸化学	高知女子大学 食品化学	教授
------	------------------------------	-----------------------------------	----------------	----

日本人の母乳中のビタミン含量

分類	n	総ビオチン量 (pmol/ml)	総パントテン酸量 (nmol/ml)	総ニコチンアミド量 (nmol/ml)
全母乳	78	15.9±5.3 ^a	24.16±6.55	18.2±5.3
21-89日成熟乳	43	16.7±6.3	26.30±6.59	19.1±5.7
夏季採取	22	16.1±5.0	26.98±5.83	20.5±5.4
冬季採取	21	17.4±7.4	25.58±7.37	17.6±5.8
90-179日成熟乳	35	14.8±3.8	21.55±5.54	17.2±4.6
夏季採取	18	13.9±3.9	20.24±4.60	18.4±4.9
冬季採取	17	15.7±3.5	22.94±6.23	15.9±4.2

^a mean±SD.

日本人の食事摂取基準(2005年版)の乳児(0~5か月)の
ビタミンの目安量の算定に使用

日本人の母乳の泌乳量 0.78l/日:上記の食事摂取基準に使用

継続中

図1. 日本人の母乳の泌乳量とビタミン含量

測定方法の開発・検討

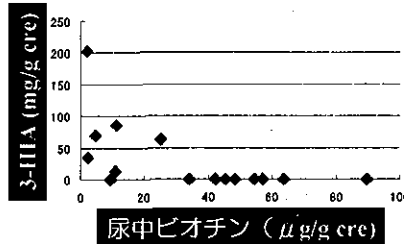
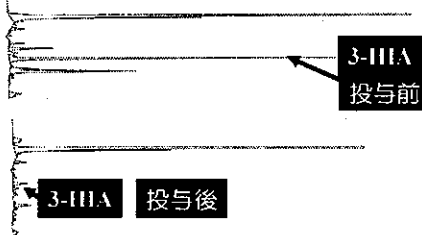
- ① 重水素標識化ビタミンD代謝物を合成。これを用いた高精度なLC/MS/MS測定法を確立。
- ② 重酸素標識化ビタミンK同族体を合成。これを用いた高精度なLC/MS/MS測定法を確立。
- ③ 日本食品標準成分表にビタミンK含有量が記載されている全ての食品について再測定を実行。
- ④ 脂溶性ビタミン(ビタミンA、D、E、K、β-カロテン)の重水素または重酸素標識体をほぼ合成し、母乳および血中濃度の一斉分析法を開発中。
- ⑤ ATPを指標としたビオチンの微生物学的定量法の検討。
- ⑥ 結合型パントテン酸の遊離型パントテン酸への転換方法の検討。
- ⑦ ビタミンB₁定量方法を検討し、安定した精度の高い方法を確立。
- ⑧ 組織中のリコペンの定量方法を開発。

図2. ビタミンの定量方法の開発

新規な栄養状態の指標の開発

HPLCによる3-hydroxyisovaleric acid(3-HIA)測定の見直し

ピオチン欠乏患者の尿中3-HIA



ビタミンB₁₂依存酵素のNon-RI高感度活性測定法の確立

- ・メチルマロニルCoAムターゼ (逆相HPLC法、生成物Succinyl-CoAを254nmで検出・定量)
 - ・メチオニンシンターゼ (逆相HPLC法、生成物THFを励起波長290nm、吸収波長356nmで検出・定量)
- ビタミンB₁₂の栄養状態の新しい指標として赤血球中のビタミンB₁₂依存酵素活性 (全活性ならびにアポ・ホク酵素活性比) が利用できるかどうか検討中。

図3. 新規なビタミン栄養指標の検索

ビタミンE (α-T) 栄養状態の加齢に伴う変化と食物アレルギーに対する作用

① 健常高齢者の血漿α-T状態

- ・血漿α-T濃度は高齢者においても比較的保持されていた。
- ・しかし、血漿VLDL-コレステロールなどの血中脂質の上昇に起因する可能性有り。

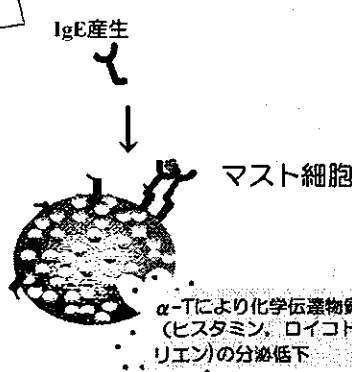
高齢者のα-T栄養状態の判定の際には血中脂質の変動を考慮することが不可欠

② 健常高齢者の血漿α-T濃度と細胞性免疫能

- ・65歳以上の高齢者においてはT細胞機能は加齢とともに低下
- ・α-T濃度/血漿VLDL-コレステロール値と末梢血T細胞機能との間に有意な正相関

高齢者には十分なα-T摂取が必要

③ 食物アレルギーの発症・進展とα-T



アレルギー症状の軽減・改善
→ α-Tの免疫調節作用の可能性

図4. ビタミンと高齢者

水溶性ビタミンの体内飽和量を維持するための摂取量

ビタミンB ₁	0.54 mg/1,000kcal	1.52 mg/1,000kcal	2.8
ビタミンB ₂	0.60 mg/1,000 kcal	2.2 mg/1,000 kcal	3.7
ビタミンB ₆	0.023 mg/g protein	0.054 mg/g protein	2.3
ニコチンアミド	5.8 mgNE/1,000 kcal	28 mgNE/1,000 kcal	4.8
パントテン酸	5 mg/day	28 mg/day	5.6
葉酸	0.2 mg/day	0.77 mg/day	3.9
ビオチン	0.045 mg/day	0.09 mg/day	2.0
ビタミンC	100 mg/day	210 mg/day	2.1

ビタミン混合

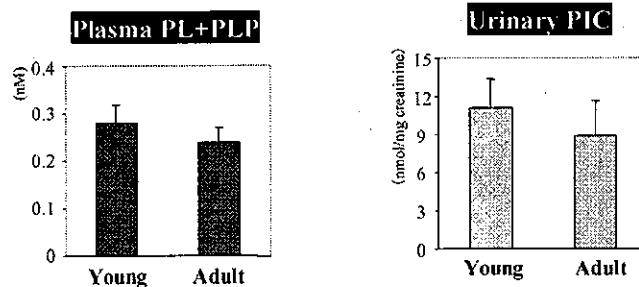
長期投与実験を開始：生活習慣病のリスクを軽減(?)

図5. 水溶性ビタミンの体内飽和量を維持する量を摂取し続けた時の生活習慣病と関連する生化学的パラメータの変動

提言 6~11か月乳児のビタミンB-6の食事摂取基準の外挿値が0~5か月乳児における母乳に基づく外挿値(0.25mg)と成人からの外挿値(0.39mg)とは大きく異なる。その原因の1つは、成長の著しい時期とそうでない時期におけるビタミンB-6必要量に差があるためではないか？

実験 成長期にあるラットと成長のほぼ停止した成熟ラットに高たんぱく食を与えた場合に各ラットのビタミンB-6の動態はどのようになるか？

結果

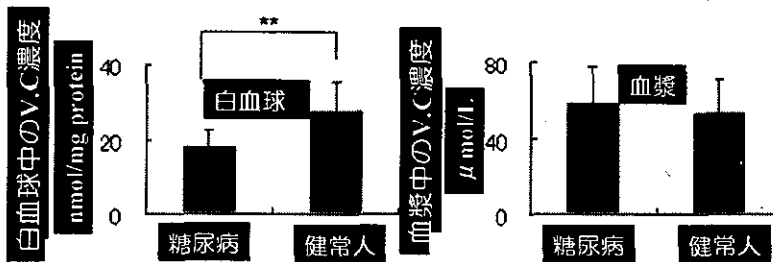


結論

血漿ビタミンB-6レベル及び尿中PIC排泄量は成熟ラットよりも若齢ラットの方が高い傾向にあった。したがって、同じたんぱく質摂取レベル下においては、若齢時では、成熟時よりもビタミンB-6必要量は低い可能性がある。

図6. 乳児から外挿した値と成人から外挿した値が乖離するビタミンB6の必要量—若齢期と成熟期の比較—

Ⅱ型糖尿病患者の白血球中と血漿ビタミンC濃度



生体のビタミンCレベルの評価を行う時、血漿ビタミンCと白血球ビタミンC等と比較し、いずれもビタミンCレベルが評価できるマーカーとなるが、通常の状態では血漿が容易な評価マーカーであることを明らかにした。

糖尿病患者のように酸化ストレスを受けるような場合には、白血球ビタミンC濃度が病気の状態と関連していることを明らかにした。

図7. 糖尿病とビタミンC

H16年度—日本人の食事摂取基準の策定に関する研究班の成果

～要約～

研究年度：3か年計画の1年目

- ①泌乳量が0.78L/日程度、ビタミン含量を精度高く測定。
- ②食品中、母乳中、血液中、尿中のビタミン含量の精度の高い測定方法を開発あるいは開発中。
- ③水溶性ビタミンの栄養状態の指標として尿中の値が適している。新規な栄養状態の指標の開発。
- ④若年成人の水溶性ビタミンの体内飽和量を求めた。
- ⑤6か月～11か月児の必要量と1歳～2歳の必要量との値に大きな乖離が見られるビタミンがある。その生化学的な背景を検討。
- ⑥データが非常に乏しい3歳～5歳の食事摂取量と尿中のビタミン量の調査を開始。
- ⑦上限量の推測のために、動物実験を行うと同時に、ビタミン-ビタミンの相互関係に関する実験に着手。
- ⑧有事（生活習慣病の一次予防、高齢者、病態時あるいは非常に過酷な環境時など）におけるビタミン必要量を知るための実験に着手。
- ⑨食事摂取基準に関する資料の電子化の作業に着手。

図8. 平成16年度—日本人の食事摂取基準の策定に関する研究班の成果のまとめ

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告

1. ヒト血清中の葉酸値とビタミン B₁₂ 含量の男女差に関する研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

血清中の葉酸値とビタミン B₁₂ 値に関して、我々が以前に行った実験では、男女差が認められた。ビタミン摂取量は同じであるにも関わらず、男性の方が有意に低い値を示した。男子学生（約 20 歳）は 8 月に実験を行い、女子学生（約 20 歳）は 3 月に行った。葉酸とビタミン B₁₂ は光に対して不安定な化合物である。8 月の被験者は、太陽の強い午後 2 時頃屋外で運動させたことが一因でもある可能性がある。今回は、食事制限をせずに、観察疫学的に、健常な男女学生を集め、昼食前の血液を採取し、血清中の葉酸値とビタミン B₁₂ 値を測定し、比較した。血液採取日は平成 16 年 11 月 25 日である。その結果、男子学生の血清葉酸値は 15.0 ± 5.8 pmol/mL（平均値 \pm SD, n=24）、女子学生は 18.0 ± 6.0 pmol/mL（平均値 \pm SD, n=33）であり、今回、有意差は認められなかった。ビタミン B₁₂ 値は 0.30 ± 0.08 pmol/mL（平均値 \pm SD, n=24）、女子学生は 0.38 ± 0.11 pmol/mL（平均値 \pm SD, n=33）であった。女子学生の方が有意に高い値を示した。今回は、食事調査を行っていないので、血液提供者の葉酸とビタミン B₁₂ 摂取量の差異は不明であるが、今回の報告と、従来報告を考え合わせると、血清葉酸値は、男性の方が低い傾向が認められることもあるが、必要量を算定する場合に、この点を考慮するか否かに関しては、男性被験者を使用した冬の介入試験を行った後にしたい。さらに、必要量に季節変動があるか否かについても検討したい。

A. 目的

今までに、男女学生を被験者としたビタミン必要量に関する介入実験を2回行った(1,2)。その結果、血清中の葉酸含量と血清中のビタミン B₁₂ 含量において、男女差が認められた。平成14年3月1日～3月8日に行われた女子学生を被験者(10名)とする実験では、血清中の葉酸含量は、 30.2 ± 8.6 pmol/mL (平均値 \pm SD)であった。一方、平成14年8月27日～9月3日に行われた男子学生を被験者(10名)とする実験では 15.6 ± 4.6 pmol/mLであり、有意な差異が認められた。血清ビタミン B₁₂ 含量においても、女子学生が 0.67 ± 0.20 pmol/mL、男子学生が 0.34 ± 0.05 pmol/mLで有意な差異が認められた。

葉酸もビタミン B₁₂ も光に対して不安定であることから、血液採取後は、光に対して十分配慮をおこなって操作を行ったが、葉酸は血管中でUVAを浴びることで破壊される危険性があるという(3,4)。つまり、夏のような強い光の下でいると、血液中の葉酸が破壊される危険性がある、という情報である。この点を考慮すると、夏に行った実験では被験者がランニング、短パンという姿で、太陽を一杯浴びていたことが気になってきた。

そこで、今回、冬に向かう11月25日に男女学生の血清中の葉酸含量を測定し、比較した。同時に男女差が認められたビタミン B₁₂ 含量についても比較した。

B. 実験方法

1. 被験者

今回の実験の趣旨を理解し、問診票に答えてくれた学生のうち、我々が健常と判断

した学生について、本人の同意を得た。そして、ビタミン剤摂取が少なくとも1週間以上ないことを再度口頭で確認後、昼食前の午後12時～13時にかけて採血を行った。

被験者の男性(24名)の年齢の平均値 \pm SDは 22 ± 1.4 歳、身長は 173 ± 6 cm、体重は 65.9 ± 9.81 kg、BMIは 21.9 ± 2.5 であった。女性(33名)の年齢の平均値 \pm SDは 21 ± 2.6 歳、身長は 158 ± 6 cm、体重は 50.9 ± 5.87 kg、BMIは 20.3 ± 1.9 であった。

2. 葉酸の測定方法

分析は、三菱BCLに依頼した。その方法は、CLIA法(chemiluminescence immunoassay)である。簡単に説明すると、血清試料に水酸化ナトリウム溶液とジチオスレイトールを加え、血清中で葉酸と結合しているタンパク質を変性させて、葉酸をすべて遊離状態とする。次に、磁性鉄微粒子でコーティングした牛乳由来の葉酸結合タンパク質とアクリジニウムエステル標識葉酸(プテロイルモノグルタミン酸)を加え、磁性鉄微粒子に結合している葉酸結合タンパク質に対し、競合的に反応させる。磁性鉄微粒子でコーティングした牛乳由来の葉酸結合タンパク質に結合した血清中の葉酸とアクリジニウムエステル標識葉酸(プテロイルモノグルタミン酸)と結合タンパク質に結合していないアクリジニウムエステル標識葉酸(プテロイルモノグルタミン酸)の分離は、磁力を用いて行い、上清を除去した。次に酸化剤として過酸化水素および硝酸、酸化補助剤として水酸化ナトリウムを加えると、アクリジニウムエステルは酸化され、結合開裂を生じ、励起状態の中間体を形成する。この中間体が基底状態に戻る時に発光するので、その光子量