

を計測し、検量線より葉酸の含量を測定するものである。

3. ビタミン B₁₂ 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、血清中でビタミン B₁₂ と結合しているタンパク質を変性させて、ビタミン B₁₂ 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精製豚内因子とアクリジニウムエステルビタミン B₁₂ (シアノコバラミン) を加え、磁性鉄微粒子に結合しているビタミン B₁₂ 内因子に対し、競合的に反応させる。磁性鉄微粒子でコーティングした精製豚内因子に結合した血清中のビタミン B₁₂ とアクリジニウムエステル標識ビタミン B₁₂ と内因子に結合していないアクリジニウムエステル標識ビタミン B₁₂ 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、その光子量を計測し、検量線よりビタミン B₁₂ の含量を測定するものである。

4. 統計処理

結果はすべて平均値±標準偏差 (SD) であらわし、Student の *t*-test により危険率 5% にて有意性を判定した。

C. 結果

1. 血清中の葉酸含量

図 1 に示したように、血清葉酸含量は男

子学生で、 15.0 ± 5.8 pmol/mL (平均値±SD, $n=24$), 女子学生で 18.0 ± 6.0 pmol/mL (平均値±SD, $n=33$) であった。有意差は認められなかった。

2. 血清ビタミン B₁₂ 含量

図 2 に示したように、男子学生のビタミン B₁₂ 値は 0.30 ± 0.08 pmol/mL (平均値±SD, $n=24$), 女子学生は 0.38 ± 0.11 pmol/mL (平均値±SD, $n=33$) であった。有意差は認められ、女子学生の方が有意に高い値を示した。

D. 考察

血清中の葉酸値とビタミン B₁₂ 値に関して、我々が行った実験 (1,2) では、男女差が認められた。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 (3)。今回は、食事制限をせずに、観察疫学的に、健康な男女学生を集め、昼食前の血液を採取し、血清中の葉酸含量とビタミン B₁₂ 含量を測定し、比較したものである。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含量は 15.0 ± 5.8 pmol/mL (平均値±SD, $n=24$), 女子学生は 18.0 ± 6.0 pmol/mL (平均値±SD, $n=33$) であった。有意差は認められなかった。

前回行った食事制限を行った介入試験 (1) では、葉酸をプテロイルモノグルタミン酸として 200μg/日摂取させた。食事性葉酸としては 340μg (遊離型、すなわちサプリメント型の葉酸は食事性葉酸の 1.7 倍の生体利用率を有するため) (5) に相当する量である。その時の値は、男子学生が 15.6 ± 4.6

pmol/mL, 女子学生が 30.2 ± 8.6 pmol/mL であった (1,2). この前回の値と比較すると, 男子学生はともに, 15 pmol/mL 程度で同じ値であったが, 女子学生においては, 今回のように通常の食事を摂取しているときの値は, 前回の値の約 30 pmol/mL の約半分の 18 pmol/mL であった. ちなみに, 今回の食事摂取基準 (2005 年版) においては, 血清葉酸含量が 7 pmol/mL 以上, 赤血球葉酸含量が 300 pmol/mL 以上, 血清ホモシステイン含量が 14 nmol/mL 未満に 50% の人が維持できる食事性葉酸の摂取量を $200 \mu\text{g}/\text{日}$ としている (6). すなわち, 推定平均必要量を $200 \mu\text{g}/\text{日}$ と策定している. 今回の男子学生において, 血清中の葉酸含量が 7 pmol/mL 未満の数は 1 名であり, その値は 5.7 pmol/mL であった. 女子学生は, 全員が 7 pmol/mL 以上の値であった.

今回のビタミン B₁₂ 含量は, 男子学生が 0.30 ± 0.08 pmol/mL (平均値 \pm SD, n=24), 女子学生が 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. 前回の介入試験 (1,2) では, シアノコバラミンとして $2.4 \mu\text{g}/\text{日}$ を摂取させ, その値が男子学生では 0.34 pmol/mL, 女子学生では 0.67 pmol/mL であった. 男子学生では, 今回の値と前回の値は有意な差異が認められなかったが, 女子学生においては, 今回の方が有意に低い値であった.

血清葉酸含量とビタミン B₁₂ 含量が, 男子の方が女子よりも低いことは, 韓国人においても報告されている (7). 韓国人の値は, 血清葉酸は, 男子が 14.7 ± 6.9 pmol/mL, 女子が 18.0 ± 8.0 pmol/mL である. 血清ビタミン B₁₂ 含量は, 男子で 0.40 ± 0.16 pmol/mL, 女子で 0.49 ± 0.23 pmol/mL である.

高齢者においても, 女子の方 (16.3 pmol/mL) が男子 (12.7 pmol/mL) よりも血清葉酸値が高いことが報告されている (8). 血清中のビタミン B₁₂ 含量においても, 女子の方 (0.60 pmol/mL) が男子 (0.48 pmol/mL) よりも高い値を示すことが報告されている (9).

前回の介入試験の時の血清葉酸含量と血清ビタミン B₁₂ 含量と比較して, 今回の観察疫学的な値と比較すると, 男子学生においては, 葉酸もビタミン B₁₂ もほぼ同じ値であった. 一方, 女子学生においては, 血清葉酸含量もビタミン B₁₂ 含量も, 前回の半分程度であった. この原因については, 不明である.

E. 健康危機情報
特記する情報なし

F. 研究発表
1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

G 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献
1. 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 14 年度 総括・分担研究報告書, 主任研究者 柴田克己, 平成 15(2003)年 4 月.
2. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N. Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, under contribution.
 3. Branda RF, Eaton JW. (1978) Skin color and nutrient photolysis: an evolutionary hypothesis. *Science*, 201:625-626.
 4. Gambichler T, Bader A, Sauermann K, Altmeyer P, and Hoffmann K. (2001) Serum folate levels after UVA exposure: a two-group parallel randomized controlled trial. *BMC Dermatol.*, 1:8 (<http://www.biomedcentral.com/1471-5945/1/8>).
 5. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF 3rd. (1997) Absorption of folate from fortified cereal-grain products and supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr*, 66:1388-1397.
 6. 厚生労働省, 日本人の食事摂取基準 (2005 年版), 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書, 2004 年 10 月.
 7. Kim H-S, Heo Y-R. (2002). Plasma total homocysteine, folate, and vitamin B₁₂ status in Korean adults. *J Nutr Sci Vitaminol*, 48:290-297.
 8. Tucker KL, Selhub J, Wilson PW, Rosenberg IH (1996) Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham Heart Study. *J Nutr*, 126:3025-2031.
 9. Fernandes-Costa F, van Tonder S, Metz J (1985) A sex difference in serum cobalamin and transcobalamin levels. *Am J Clin Nutr*, 41:784-786.

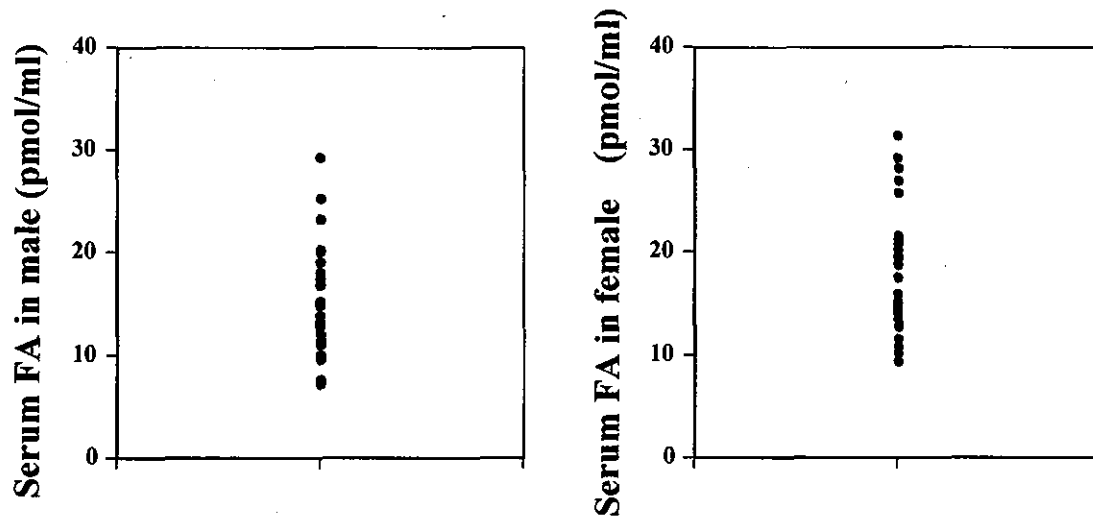


図1. 通常食摂取時の男女学生の血清葉酸含量

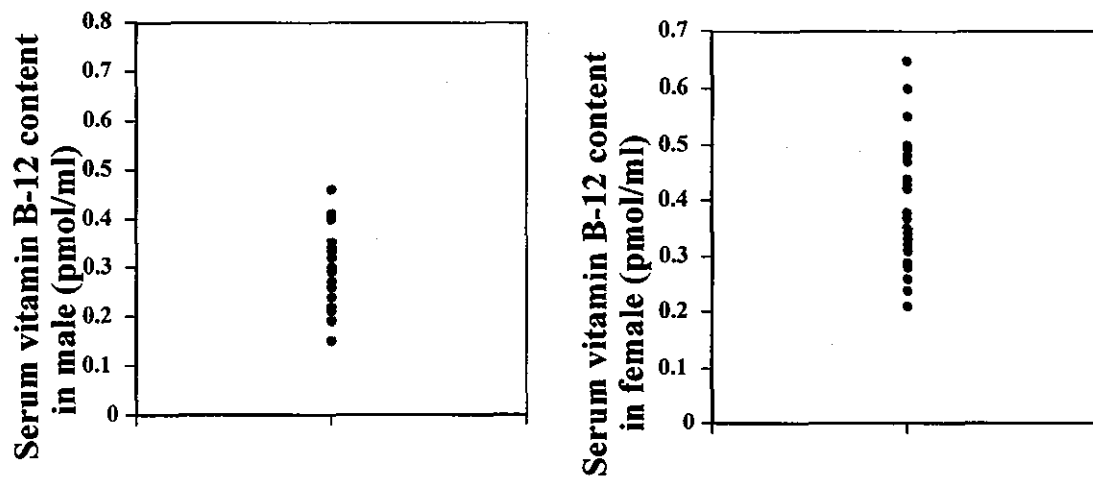


図2. 通常食摂取時の男女学生の血清ビタミンB₁₂含量

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

2. ヒト全血中のビタミン B₁, ビタミン B₂ 及び NAD 含量,
 並びに血清ビタミン C 含量に関する研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

男女学生の全血中のビタミン B₁, ビタミン B₂ 及び NAD 含量を測定した。その結果, 次の値が得られた。

	男子学生 (平均値±SD, n=24)	女子学生 ((平均値±SD, n=33)
年齢	22±1.4	21±2.6
身長 (cm)	173±6	158±6
体重 (kg)	65.9±9.8	50.9±5.9
BMI	21.9±2.5	20.3±1.9
B ₁ (pmol/mL)	99±25	101±25
B ₂ (pmol/mL)	129±1.4	137±39
NAD (nmol/mL)	30±5	31±5

男女学生の血清ビタミン C, 葉酸, ビタミン B₁₂ 含量を以下に示した。

	男子学生 (平均値±SD, n=24)	女子学生 ((平均値±SD, n=33)
C (nmol/mL)	40±16	54±14
葉酸 (pmol/mL)	15.0±5.8	18.0±6.0
B ₁₂ (pmol/mL)	0.30±0.08	0.38±0.11

なお, 葉酸とビタミン B₁₂ に関しては, この前頁の報告に記載済みである。

A. 目的

代謝が最も盛んな時期である、若年成人の血液中の水溶性ビタミンの値を知るために行った。前回 (1,2), 第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-に従った栄養素組成をまねた半合成食を投与した時の男女学生の血液中の水溶性ビタミン含量について報告したので、今回は、自由に食事を摂取させた時の値を求めた。

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

2. ビタミンB₁の測定方法

基本的には、木村ら(3)が開発したポストカラム法を改良した柴田法(4)で行った。操作の概略を以下に示した。

全血中からの総ビタミンB₁の抽出操作を示す。この抽出操作では、TDP, TMP, チアミンが抽出される。

全血 150μl

5%TCA 300μL

↓

混合

↓ 遠心分離 10000rpm, 5分間

*氷中保存

上清

↓ 0.45 μm のフィルターでろ過

HPLC 注入用試料

50μl 注入

【測定条件】

移動相 : 0.2M NaH₂PO₄
反応液 : ①0.01% K₃Fe(CN)₆
流速 0.15ml/min
②15% NaOH
流速 0.15ml/min
カラム : Shodex Rs-pak NN-614
(φ6.0×150mm)
カラム温度 : 40℃
検出器 : RF-550 SHIMAZU
検出方法 : 蛍光法
(励起波長 365nm、蛍光波長 435nm)

【試薬作成方法】

0.1M 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]

$1180 \times 36 / 100 = 424.8$ (g) …1Lに含まれる塩酸量

$424.8 / 36.5 = 11.6$ mol / L …1L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 (冷蔵保存)

Thiamin Hydrochloride = 337.27 (和光純薬工業株式会社、常温保存)

1. C₁₂H₁₇ClN₄OS · HCl を 10 mg 秤量し、0.1M HCl 10 ml に溶解した。(1 mg/ml V.B₁)
2. 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、OD_{246nm}=14200 より正確な濃度を求め、これを標準液とした。

移動相

0.2M NaH₂PO₄

Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate = 156.01

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

(和光純薬工業株式会社、室温保存)

NaH₂PO₄·2H₂O 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、2L 作成した。

反応液

0.01% K₃ [Fe(CN)₆]

Potassium Hexacyanoferrate(III)

K₃ [Fe(CN)₆] = 329.25 (和光純薬工業株式会社、室温保存)

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

K₃ [Fe(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するので、ドラフト内で氷水で冷やしながら行った。)

【計算方法】

1. 標準を流し、1pmol 当たりの面積を計算した。

[1pmol 当たりの AREA → 5000 前後]

$$2. \text{ AREA} / (1 \text{ pmol 当たりの面積}) \times 300 \mu\text{l} / 50 \mu\text{l} \times 1000 \mu\text{l} / 150 \mu\text{l} = \text{ ___ pmol / 全血 1ml}$$

※ 300μl …… 血液 150μl + 5%

TCA 300μl の上清量

50μl …… インジェクション量

1000/150 μl …… 血液 1ml に換算

【試薬作成方法】

5%TCA 溶液

Trichloroacetic Acid=163.39 (和光純薬工業株式会社、室温保存)

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

TDP 標準溶液

Thiamin pyrophosphate chloride=460.8

1. 5×10⁻³M TDP 作成

TDP を 0.0230g 秤量し、5%TCA 10ml に溶解した。

2. 5×10⁻⁴M TDP 作成

1. を 0.1ml 取り、5%TCA 0.9ml 加えて 10 倍希釈し、よく混合した。

3. 5×10⁻⁶M TDP 作成

2. を 0.1ml 取り、5%TCA 9.9ml 加えて 100 倍希釈し、よく混合した。

4. 5×10⁻⁷M TDP 作成

3. を 0.1ml 取り、5%TCA 0.9ml 加えて 10 倍希釈し、よく混合した。

これを標準溶液として用いた。

TMP 標準溶液

Thiamin monophosphate chloride=416.8

1. 5×10⁻³M TMP 作成

TMP を 0.0208g 秤量し、5%TCA 10ml

に溶解した。

2. 5×10^{-4} M TMP 作成

1.を 0.1ml 取り, 5%TCA0.9ml 加えて 10 倍希釈し, よく混合した。

3. 5×10^{-6} M TMP 作成

2.を 0.1ml 取り, 5%TCA9.9ml 加えて 100 倍希釈し, よく混合した。

4. 5×10^{-7} M TMP 作成

3.を 0.1ml 取り, 5%TCA0.9ml 加えて 10 倍希釈し, よく混合した。

これを標準溶液として用いた。

Thiamin 標準溶液

Thiamin Hydrochloride=337.27

1. 5×10^{-3} M Thiamin 作成

Thiamin を 0.0169g 秤量し, 5%TCA10ml に溶解した。

2. 5×10^{-4} M Thiamin 作成

1.を 0.1ml 取り, 5%TCA0.9ml 加えて 10 倍希釈し, よく混合した。

3. 5×10^{-6} M Thiamin 作成

2.を 0.1ml 取り, 5%TCA9.9ml 加えて 100 倍希釈し, よく混合した。

4. 5×10^{-7} M Thiamin 作成

3.を 0.1ml 取り, 5%TCA0.9ml 加えて 10 倍希釈し, よく混合した。

これを標準溶液として用いた。

2. ビタミン B₂ の測定方法

全血中ビタミン B₂ (Riboflavin, FMN, FAD) 量測定方法

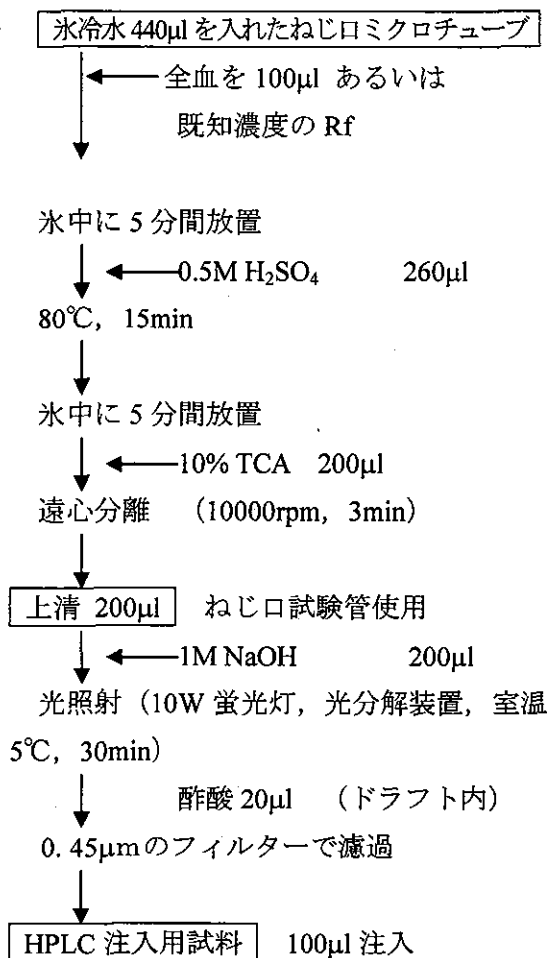
大川ら (5) が開発したルミフラビン-HPLC 法にて測定を行った。

【サンプル前処理】

1. ねじロマイクロチューブ(2ml)に水 440μl を入れ, 氷冷した。

2. 血液 100μl 採血後, 直ちに 1. に加え, タッチミキサーで攪拌した。

【サンプル作成】



※照射することで, 試料中の Riboflavin, FMN, FAD を Lumiflavin に分解し, 総ビタミン B₂ とするものであるが, Riboflavin, FMN, FAD は 100% Lumiflavin に転換されるわけではない。そこで, 転換率を求めるために, 既知濃度の Riboflavin 標準液を試料として上記の操作を同時に行った。

【測定条件】

移動相: 1M NaH₂PO₄ (pH5.5) 6.5ml
Methanol 350ml

超純水 643.5ml
 流速： 0.8ml/min
 カラム： Tosoh ODS-80TS
 (φ4.6×250mm)
 カラム温度： 40℃
 検出器： SHIMADZU RF-10AXL
 検出方法： 蛍光法 (励起波長 445nm,
 蛍光波長 530nm)
 Auto injector : stop time 20min
 データプロセッサ : stop time 19min
 Lumiflavin 1pmol 当たりの AREA : 13,000
 Riboflavin から Lumiflavin への転換率 : 75%
 前後

【計算方法】

- 1) Lumiflavin 標準 1pmol 当たりの AREA...a
- 2) Riboflavin から Lumiflavin への転換率
 転換率 : 試料液全量 1000μl, そこに含まれる試料 100μl. 100/1000
 光照射に用いる液量 200μl
 光照射された試料の全量 420μl,
 HPLC 注入量 100μl. 100/420
 $100/1000 \times 200 \times 100/420 = 4.76\mu\text{l}$
 正確な濃度を求めた Riboflavin 標準
 4.76μl 中に含まれるモル数を求めた...b
 $(\text{既知濃度の Riboflavin 検出 AREA}) / a \times 1 / b \times 100 = c\%$
- 3) (検出 AREA) / a × 1000μl / 4.76μl* × 100 / c = __ pmol/ml

※ 4.76μl = 注入量 100μl 中に含まれる試料の量

【試料の調整方法】

Lumiflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

Lumiflavin = 256.3 (SIGMA)

1. Lumiflavin を 0.0010g 秤量し, 超純水

10ml に溶解させた. (100μg/ml)

2. 1 を 500μl とり, 超純水 9.5ml 加えて, 20 倍希釈した. (10μg/ml)
3. 2 の吸光度を測定し, $\epsilon 441.0 = 10,900$ より正確な濃度を求めた.
4. 3 を 20μl とり, 1180μl の超純水を加えて 60 倍希釈し, 標準とした.

Riboflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

Riboflavin = 376.36 (和光純薬工業株式会社, 一級試薬)

1. Riboflavin を 0.010g 秤量し, 0.1M KPB (pH7.0) 10ml を加え, 懸濁液を均一化した.
2. 1 を 100μl とり, 0.1M KPB (pH7.0) 9.9ml に溶解させた.
3. 2 の吸光度を測定し, $\epsilon 445.0 = 12,500$ より正確な濃度を求めた.
4. 3 を 200μl に 0.1M KPB (pH7.0) 200μl 加え使用した.
5. 4 を 100μl に 0.1M KPB (pH7.0) 400μl 加えし使用した.

0.5M H₂PO₄ (冷蔵保存)

Sulfuric Acid 96.0~98.0% 18M (和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

超純水 972.2ml に硫酸 27.8ml を加え, 氷で冷やしながらか溶解させた.

10%TCA (室温保存)

Trichloroacetic Acid = 163.39 (和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

TCA を 20g 秤量し, 超純水 180ml で溶解させた.

1M NaOH (冷蔵保存)

Sodium Hydrogenphosphate = 40.00 (和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

$$40.00 \times 0.1 \times 1 = 4.0$$

NaOH を 4.0g 秤量し, ドラフト内で氷合しながら (熱と臭気を発するため) 80ml の超純水に溶解させ, 100ml に定容した。

酢酸

和光純薬工業株式会社, 特級試薬をそのまま使用

3. NAD の測定方法

柴田ら(6)が開発した酵素サイクリング法を用いた。

4. ビタミン C の測定方法

ビタミン C を酸化型アスコルビン酸 {DHA+DKG} に変換し, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を反応させて生成するオサゾン (デヒドロアスコルビン酸ビス-ジニトロフェニルヒドラゾン) を HPLC で特異的に定量した(7)。

C. 結果

1. 全血中の総ビタミン B₁ 含量

図 1 に示したように, 全血ビタミン B₁ 含量は男子学生で, 99±25 pmol/mL (平均値±SD, n=24), 女子学生で 101±25 pmol/mL (平均値±SD, n=33)であった。有意差は認められなかった。

2. 全血中の総ビタミン B₂ 含量

図 2 に示したように, 男子学生のビタミン B₂ 値は 129±35 pmol/mL (平均値±SD, n=24), 女子学生は 137±39 pmol/mL (平均値±SD, n=33)であった。有意差は認められなかった。

3. 全血中の NAD 含量

図 3 に示したように, 男子学生の NAD 値

は 30±5 pmol/mL (平均値±SD, n=24), 女子学生は 31±5 pmol/mL (平均値±SD, n=33)であった。有意差は認められなかった。

4. 血清中のビタミン C 含量

図 4 に示したように, 血清ビタミン C 含量は男子学生で, 40±17 pmol/mL (平均値±SD, n=24), 女子学生で 54±14 pmol/mL (平均値±SD, n=33)であった。女子学生の方が有意に高い値であった。

D. 考察

全血中のビタミン B₁ 値に関しては, 普通食摂取時の日本人のデータが報告されており, 中年男性で 119±33 pmol/mL (n = 524), 中年女性で 104±27 pmol/mL (n = 345) と報告されている(8)。前回の介入試験においても, 男子学生が 104±17 pmol/mL, 女子学生が 90±23 pmol/mL であり(1,2), 今回の値とほぼ同じであった。つまり, 血液中のビタミン B₁ 値は男女差もなく, 年齢による差異 (中年と若年成人) もないことが明らかとなった。

日本人の全血中のビタミン B₂ 含量に関しては, 平岡が(9)報告した女子学生においては 225 pmol/mL とされている。前回の報告(1,2)においても, 全血中のビタミン B₂ 含量は男子学生で 216±25 pmol/mL, 女子学生で 234±18 pmol/mL であった。ところが, 今回は, これらの値の半分の 130 pmol/mL 程度であった。いずれの結果においても, 男女差は認められなかったが, 今回の値が平岡(9)と前回(1,2)の値の半分であった原因については不明である。

日本人の全血中の NAD 含量に関する報告はすでに, 我々のものが数多くある。いずれの値も 30 nmol/mL 程度である(10)。今

回の値も、男女ともに 30 nmol/mL 程度であり、男女差は認められなかった。

血清中のビタミンC含量を測定した。血清中のビタミンC含量に関しては、Levineらは(11)、 62 ± 10 nmol/mL (n = 15, 女性)と報告している。Kobataらは(12)、7人の女性に111mgのビタミンCを投与した時の血清ビタミンC含量は 57 ± 11 nmol/mLであったと報告している。今回は自由に摂取させた時の血清ビタミンC含量であるが、男子学生が 40 ± 17 nmol/mL、女子学生が 54 ± 14 nmol/mLであった。男子学生の血清ビタミンC含量が女子学生よりも有意に低い値を示したが、原因は不明である。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

G 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献

1. 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14年度 総括・分担研究報告書、主任研究者 柴田克己、平成15(2003)年4月。

2. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N. Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, under contribution.
3. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. (1982) Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin Chem*, 28:29-31.
4. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己 (2004) 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. *食品衛生学雑誌*, 45:231-238.
5. Ohkawa H, Ohishi N, Yaagi K. (1982) A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int*, 4:187-194.
6. Shibata K, Murata K. (1986) Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nutr Int*, 2:177-181.
7. Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S. (1992) Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography.

Anal Chem, 64:1501-1507.

8. Takeda A, Suyama T, Suzuki T, Imanishi M, Takeda R, Kitamura R, Tamai H, Kimura M. (2002) Vitamin B₁ nutritional status assessed by blood vitamin B₁ value of middle aged Japanese men and Women. *Vitamins*, 76:349-353.
9. Hiraoka M. (2001) Nutritional status of vitamin A, E, C, B1, B2, B6, nicotinic acid, B12, folate, and β -carotene in young women. *J Nutr Sci Vitaminol*, 47:20-27.
10. Shibata K. (1987) Blood pyridine nucleotide levels reflect niacin equivalent intake in humans. *J Clin Biochem Nutr*, 3:493-499.
11. Levine E, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. (2001) A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 98:9842-9846.
12. Kobata T, Inoue K, Ishii K, Higuchi M. (1998) Vitamin status in young women with different physical activity level. *Vitamins*, 72:363-371.

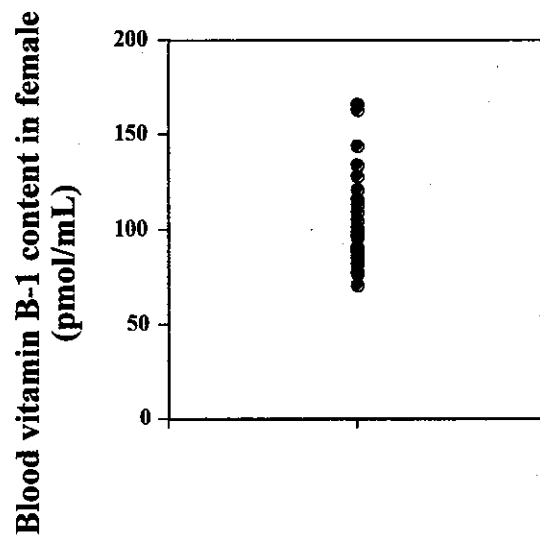
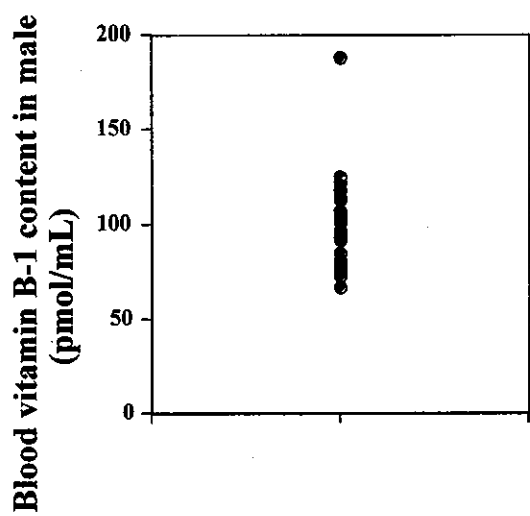


図 1. 自由食摂取時の全血中のビタミン B₁ 含量

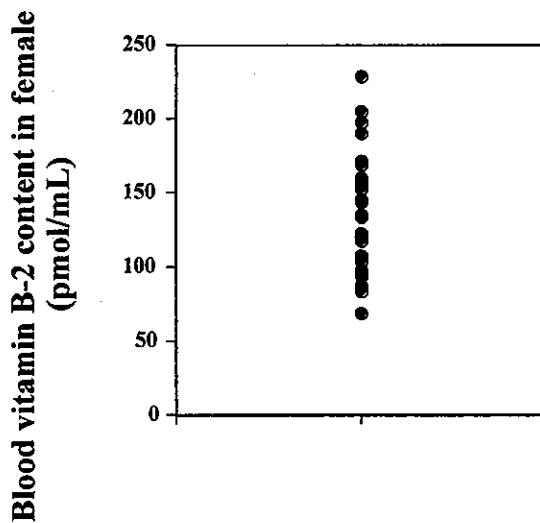
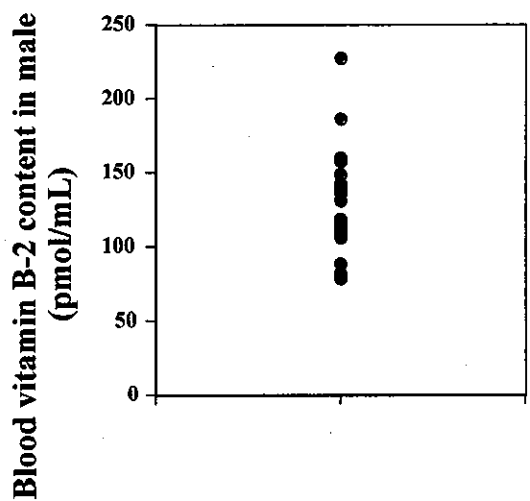


図 2. 自由食摂取時の全血中のビタミン B₂ 含量

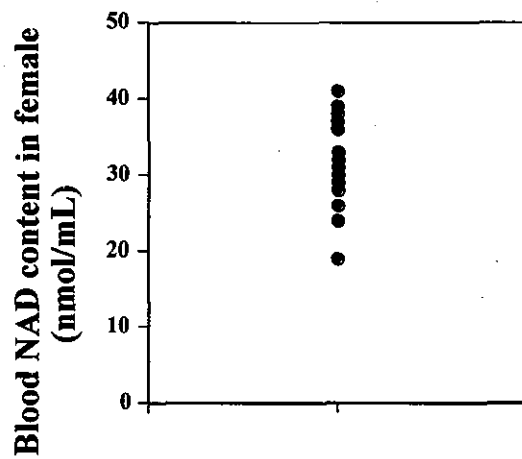
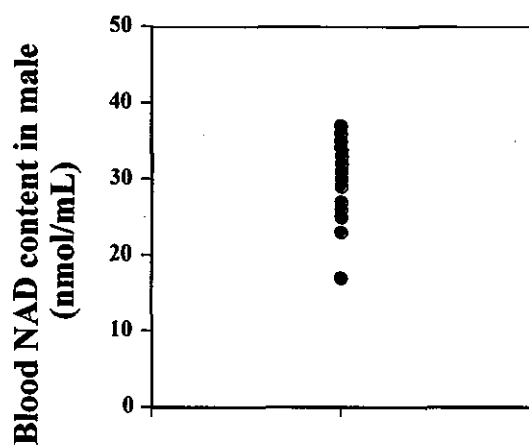


図 3. 自由食摂取時の全血中の NAD 含量

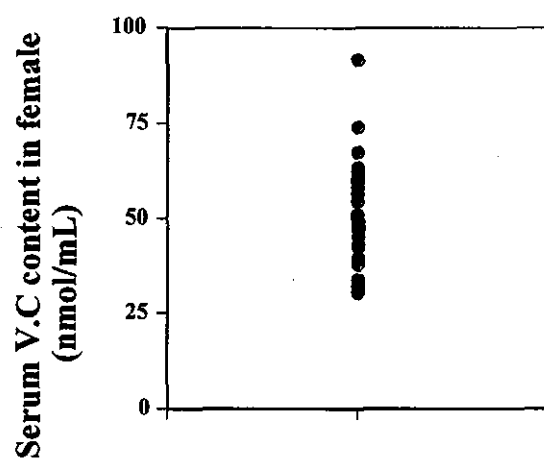
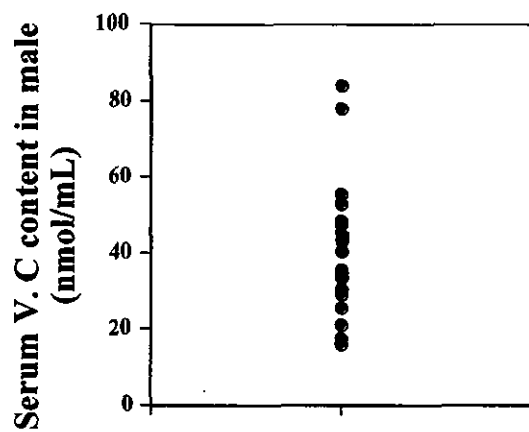


図 4. 自由食摂取時の血清ビタミン C 含量

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. 主任研究者の報告書

3. ビタミンの上限量の検討 -葉酸-

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究では、葉酸の上限量を考える際に必要な基礎データを得るために、葉酸を継続的に大量摂取させた影響について、ラットを用いて調べた。その結果、①葉酸の大量摂取（1%添加食）においても、幼若ラットの成長障害も飼料摂取量の低下も認められず、下痢も見られなかった。②B群ビタミン代謝に葉酸の大量投与による影響はみられなかった。③ラットにおいて、葉酸を少なくとも840 mg/kg 体重/日まで継続的に摂取させても悪影響は現れず、ラットのNOAELは840 mg/kg 体重/日以上であるといえた。今回は、飼料に葉酸を重量で1%となるように混餌したものを30日間連続投与したが、健康障害はみられなかった。仮に人間においてこの値を利用するならば、ラットと人間という種差、個体差、30日間という短期毒性試験であるという点を考慮し、不確定因子として1000で除した0.8 mg/kg weight/day 以上という値がNOAELの最低値であると考えることができる。60 kgの人ならば、5 mg/日程度を上限量と、考えてもさしつかえないであろう。

A. 目的

葉酸はB群の水溶性ビタミンの一つである。近年、妊娠初期の葉酸の十分な摂取は、胎児神経管閉鎖障害の予防に効果があるとされている(1)。神経管閉鎖障害は、主に、先天性の脳や脊髄の癒合不全のことをいい、脊髄の癒合不全を二分脊髄という。そして現在、妊婦への400 μ g/日の葉酸摂取が厚生労働省から通知されている(2)。しかし、通常の食品のみからの摂取は200 μ g/日程度であるため妊婦の必要量を満たすことが困難であり、したがって、諸外国のようにサプリメントによる補足が必要となる。しかし、その簡便性や知識不足などによって過剰摂取する危険性があり、健康障害が懸念される。そのため、上限量の設定が必要となる。

日本人の食事摂取基準(2005年度版)の概要(3)によると18歳以上の男女の葉酸の上限量は1000 μ g/日である。しかしこの値はNOAEL(健康障害非発現量)により算出されたものであり(4)、葉酸のLOAEL(健康障害最低発現量)はわかっていない。葉酸の過剰害としては、主に神経障害などが言われている。また葉酸を摂取しすぎているとビタミンB₁₂不足によって起こる巨赤芽球性貧血を隠してしまう(5)。葉酸によるこれらの過剰害を防ぐためにも、葉酸の上限量を決定する上でNOAELだけではなくLOAELも算出する必要がある。

本研究は、葉酸のLOAELを算出することを最終目標とした研究である。葉酸の大量投与実験を、ヒトに対して行うことは倫理的に不可能であるので、ラットに大量の葉酸を投与し、体重増加量、飼料摂取量の測定、尿中の水溶性ビタミン量の測定、臓

器重量及び肝臓中、血液中の葉酸量の測定から、葉酸のLOAELを検索した。

B. 研究方法

動物飼育

(1)飼育, 採尿, 解剖方法

〈飼育方法〉

3週齢のWistar系雄ラット20匹を日本クレア株式会社より購入し、平均体重がほぼ均等になるように5匹ずつ4群に分けて、ラット用代謝ケージに入れた。その日から、表1に示した飼料を与えた。20% Casein食をControl食とし、大量投与群には20% Casein食に葉酸を0.01%、0.1%、1.0%添加したもので飼育した。飼料と水は自由摂取とし、1日ないし2日置きに新しいものに交換した。ラットの世話は午前8時~10時の間に行い、体重と飼料摂取量を測定した。飼育条件としては、室温20℃、湿度60%、午前6時~午後6時を明、午後6時~翌朝6時を暗とする明暗サイクルで行った。

実験開始日をDay 0として、飼育最終3日にあたるDay 27, Day 28, Day 29の1日尿(午前9時~翌朝午前9時:24時間)を集めた。尿は塩酸酸性下で、-20℃で保存した。

飼育4週間目に当たるDay 30に断頭屠殺し、採血及び肝臓、腎臓、肺、脾臓、心臓、精巣、脳の摘出を行い、各臓器の重量を測定した。また、尿中のB群ビタミン量、肝臓中、血液中の葉酸量を測定した。

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は22℃前後、湿度は50%前後、午前6時~午後6時を明、午後6時~午前6時を暗とした。3週齢のWistar系雄ラット20匹を日本クレア(株)

より購入し、平均体重がほぼ等しくなるよう4匹ずつ5群に分け、ラット用代謝ケージに入れた。20%カゼイン食にチアミン塩酸塩を0.0006, 0.006, 0.06, 0.18, 1.0%添加した食餌を与え、30日間飼育した。飼料と水は自由摂取とし、1日ないし2日おきの午前9時~10時に新しいものと交換した。また、その際に体重と飼料摂取量を測定した。飼育最終日の1日尿および1日糞(午前10時~翌日午前10時:24時間)を集めた。飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し、血液を採取した。脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣を摘出し、各臓器重量を測定した。血液、肝臓はチアミンの測定に使用した。尿はチアミン、リボフラビン、4-ピリドキシン酸、ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸、葉酸、アスコルビン酸の測定に使用した。

分析(6)

尿中チアミン含量の測定として、尿を0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl をHPLCによる分析に供した。分析条件は、カラム: Shodex Rs-pak NN-614 ($\phi 6.0 \times 150 \text{ mm}$), 移動相および流速: 0.2 M NaH_2PO_4 , 1.0 ml/min, 反応液: 0.01% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.15 ml/min および 15% NaOH, 0.15 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光光度計, 励起波長 365 nm, 蛍光波長 435 nm とし、ポストカラム法を用いた。

尿中リボフラビン含量の測定として、尿を0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl をHPLCによる分析に供した。分析条件は、カラム: Tosoh ODS-80Ts ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$), 移動相: 10 mM NaH_2PO_4 (pH 5.5)-メタノール (70:30 v/v), 流速: 0.8 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光光度計, 励起波

長 445 nm, 蛍光波長 530 nm とした。

尿中4-ピリドキシン酸含量の測定として、尿を0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl をHPLCによる分析に供した。分析条件は、カラム: TSKgel ODS-120A ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$), 移動相: 2.2%リン酸 (pH 2.2)-メタノール (90:10 v/v), 流速: 1.0 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出器: 蛍光光度計, 励起波長 355 nm, 蛍光波長 436 nm とした。

尿中ニコチンアミド代謝産物量はニコチンアミド, N^1 -メチルニコチンアミド (MNA), N^1 -メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N^1 -メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計とした。尿中ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py 各含量の測定として、尿1 ml に炭酸カリウム 1.2 g を添加した後、ジエチルエーテル 10 ml を加えてよく混合し、エーテル層を蒸発乾固させた。この乾固物を水 0.5 ml に溶解し、0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl をHPLCによる分析に供した。分析条件は、カラム: Chemcosorb 7-ODS-L ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$), 移動相: 10 mM KH_2PO_4 (pH 3.0)-アセトニトリル (96:4 v/v), 流速: 1.0 ml/min, カラム温度: 25°C, 検出器: 紫外分光光度計 260 nm とした。内部標準であるイソニコチンアミドのピーク面積から回収率を求め、ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py 量を算出した。

尿中MNA含量の測定として、尿0.1 ml, 水0.7 ml, 1Mイソニコチンアミド溶液0.2 ml, 0.1Mアセトフェノン溶液0.5 mlを混合した後、6M NaOH溶液1 mlを加えて10分間氷冷し、99%ギ酸0.5 mlを加えて15分間室温で放置した。沸騰水浴中で5分間放置した後、十分に氷冷し、遠心上清を0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl をHPLCに

よる分析に供した。分析条件は、カラム：Tosoh ODS 80Ts (φ4.6 x 250 mm), 移動相：1 g/L 1-ヘプタスルホン酸ナトリウムおよび1 mM EDTA-2Na を含む 20 mM KH₂PO₄ (pH 3.0)-アセトニトリル (97:3 v/v), 流速：1.0 ml/min, カラム温度：40°C, 検出器：蛍光光度計, 励起波長 382 nm, 蛍光波長 440 nm とした。

尿中パントテン酸含量の測定として、尿 10 μl を含むパントテン酸定量用基礎培地 (日本製薬株式会社) 2 ml に *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 を接種した。16 時間培養後、比色計を用いて 660 nm における濁度を測定した。

尿中葉酸含量の測定として、尿 10 μl を含む葉酸定量用基礎培地 (DIFCO) 2 ml に *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 2733 を接種した。22 時間培養後、比色計を用いて 660 nm における濁度を測定した。

尿中アスコルビン酸含量の測定として、尿 100 μl に 0.2% 2,6-ジクロロインドフェノール 100 μl, 1% 塩化スズ-5% メタリン酸 50 μl, 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 M 硫酸 120 μl を加えて混和し、37°C で 3 時間放置後、水 1 ml, 酢酸エチル 1 ml を加えて混和した。遠心分離後、酢酸エチル層 600 μl を蒸発乾固させ、乾固物をアセトニトリル 200 μl に溶解し、0.45 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：μ Bodasphere 5 μ C18-100A (φ3.9 x 150 mm), 移動相：0.1% トリエチルアミン (pH 3.0)-アセトニトリル (50:50 v/v), 流速：1.0 ml/min, カラム温度：40°C, 検出器：紫外分光光度計 505 nm とした。

C. 結果と考察

◆葉酸の大量投与が幼若ラットの成長に及ぼす影響

体重増加量、飼料摂取量を示した (図 1) Control 群と試験群で体重増加量と飼料摂取量に差は見られなかった。飼育中、下痢をしているラットはいなかった。また肉眼的所見において、毛並み、臓器に影響は認められず、行動異常も認められなかった。

◆葉酸の大量投与が臓器重量に及ぼす影響の比較

臓器重量において、Control 群と試験 3 群に差異は認められなかった (表 2)。

◆葉酸の大量投与が肝臓、血液中の葉酸量におよぼす影響の比較

肝臓中の葉酸量に大きな差異は認められなかった (図 2-A)。したがって肝臓中の葉酸は Control 群において既に飽和状態であったといえる。

また、血液中の葉酸量は Test 群の 3 群では差が見られなかった (図 2-B)。したがって、血液中の葉酸は 0.0102% 群で飽和状態になっていたと考えられる。

◆葉酸の大量投与が尿中の葉酸排泄量におよぼす影響の比較

尿中葉酸排泄量は Control 群に対して葉酸大量投与群で多く、差がみられ、摂取量に応じ尿中の葉酸排泄量は増加した (図 3-A)。

また、葉酸排泄率は葉酸の摂取量に応じて順に低くなった (図-3B)。Control 群に比べ 0.01% 群では排泄率が大きく低下していた。したがって、0.01% 群で葉酸がすでに飽和状態であったと考えられる。

◆葉酸の大量投与が B 群ビタミンの代謝におよぼす影響

葉酸を含めて、B群ビタミンは補酵素として糖質、脂質、アミノ酸代謝において共同作業を行っているので、葉酸の大量摂取により、他のビタミン代謝の均衡を崩すおそれがある。葉酸のみに着目して影響が見られなかったとしても、他のB群ビタミンに影響があれば、それは葉酸過剰摂取によるものと考えられる。しかし、図4に示したように、ビタミンB₁ (図4-A)、ビタミンB₂ (図4-B)、ビタミンB₆ (図4-C)、ビタミンB₁₂ (図4-D)、パントテン酸 (図4-E)、ビオチン (図4-F) の尿中への排泄量は、葉酸の大量摂取によって全く影響を受けなかった。

◆葉酸の大量投与が尿中(2-Py+4-Py)/MNA比に及ぼす影響の比較

栄養状態に偏りが生じると、ニコチンアミド異化代謝産物であるMNAから4-Pyに流れるための酵素の働きが悪くなり、4-Pyの排泄量が減少してくる(7)。故に、尿中の(2-Py+4-Py)/MNA比は栄養状態を知る上でよい指標となる。測定したところ図5に示したように、このナイアシン異化代謝産物排泄量比は葉酸の大量摂取によって、なんら影響を受けなかった。

したがって、ラットにおいて飼料中の葉酸含量が少なくとも1.0%までは悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。1%添加群の飼育最終日の平均体重は190.4gであり、葉酸の摂取量の平均値が160mg/日であった。したがって、ラットにおいて少なくとも $160/190.4 \times 1000 = 840 \text{ mg/kg weight/日}$ の摂取は影響が認められないものと思われた。LOAELが不確定であるので、ラットのNOAELはこの値以上であると考えられる。仮に人間においてこの値を利用するならば、

ラットと人間という種差、個体差、30日間という短期毒性試験であるという点を考慮し、不確定因子として1000で除した0.8 mg/kg weight/day以上という値がNOAELの最低値であると考えられる。60 kgの人ならば、5 mg/日程度を上限量と、考えてもさしつかえないであろう。

D. 健康危機情報

特記する情報なし

E. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

F. 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

G. 引用文献

1. Emery AE. (1977) Folates and fetal central-nervous-system malformations. *Lancet*, 26:1(8013):703.
2. 「神経管閉鎖障害の発症リスク提言のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について」、児母第72号、健医地生発第78号、平成12年12月28日、厚生省自動家庭局母子保健課長、厚生

省保健医療局地域保険・健康増進栄養課生活習慣病対策室長。

3. 厚生労働省ホームページ:日本人の食事摂取基準について。
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/11/h1122-2.html>
4. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. The B vitamins and choline: overview and methods. In: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: For thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, D. C., National Academy Press, 1998: 196-305.
5. Sinow RM, Johnson CS, Karnaze DS, Siegel ME, Carmel R. (1987) Unsuspected pernicious anemia in a patient with sickle cell disease receiving routine folate supplementation. Arch Intern Med, 147:1828-1829.
6. 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率推進臨床研究事業, 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, 平成 16 (2004) 年 4 月.
7. 柴田克己 (1990) ニコチンアミドの異化代謝産物、 N^1 - メチルニコチンアミドとそのピリドン体の排泄量比とアミノ酸栄養との関係. ビタミン, 64:1-18.