

図3. 成人と幼児の体表面積当たりの尿中排泄量

(● : 成人男, n = 10, ○ : 成人女, n = 10, ◆ : 幼児, n = 28. 異なるアルファベット間で  $p < 0.05$  の有意差あり)

平成 17 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

### 7. ラットにおける脂質摂取量と尿中パントテン酸排泄量との関係

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

パントテン酸は、脂質代謝に深く関わっているが、パントテン酸の必要量が脂質の摂取量と相関するの否かに関する情報は乏しい。ラットを用いて、脂質摂取量と尿中に排泄されるパントテン酸量との関係を調べた。3週齢のWistar系雄ラットに20%カゼイン食にコーン油を5%添加したものを対照群とし、高脂肪食群として、コーン油を10%・20%・30%含む飼料を与え、28日間飼育した。その結果、尿中のパントテン酸排泄量は、コーン油の摂取量の増大にともなって有意に減少した。このことは、脂質摂取量の増加に伴いパントテン酸の必要量が高まったものと考えられた。

## A. 目的

B 群ビタミンの一つであるパントテン酸は、補酵素である CoA やアシルキャリアー蛋白質の構成成分であり、さまざまな代謝に関与している。その中でも特に脂質代謝において重要な役割を担っている。しかし、脂質摂取量の増加に伴うパントテン酸の必要量は明らかになっていない。そこで、パントテン酸の栄養指標となるパントテン酸の尿中排泄量を調べ、脂質摂取量との関係を明らかにすることを目的とした。

また、B 群ビタミンは協調して、糖質、脂質、アミノ酸の代謝に関与し、補酵素として重要な役割を担うことが知られているため、他の B 群ビタミンの尿中排泄量も加えて測定することとした。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

ビタミンフリーミルクカゼイン、ショ糖、L-メチオニンは和光純薬工業（株）より購入した。α-コーンスターチは日澱化学工業（株）より、コーンオイルは味の素（株）より購入した。ミネラル混合（AIN93-M 配合）、ビタミン混合（AIN93 配合）、セルロースパウダーはオリエンタル酵母工業（株）より購入した。

### 2. 動物飼育

本実験は滋賀県立大学実験動物委員会で承認を受けた。

飼育室の温度は 22°C 前後、湿度は 60% 前後に維持し、暗明サイクルは、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（CT-10、日本クレア

（株）製）に一匹ずつ入れて飼育した。その日から、表 1 に示した飼料を与えた。表 2 には、飼料の総エネルギー量と脂質エネルギー量が占める割合を示した。20%カゼイン食投与群をコントロール群とし、高脂肪食群には 20%カゼイン食にコーン油を 10%、20%、30%添加した飼料を与えた。飼料と水は自由摂取とし、毎日新しいものに交換した。ラットの世話は午前 8 時～午後 10 時の間に行い、体重と飼料摂取量を測定した。

実験開始日を Day 0 として、飼育最終日の Day 28 の 1 日尿（Day 28 の午前 9 時～Day 29 の午前 9 時：24 時間）を集めた。尿は塩酸酸性下で集め、一部はビタミン C 測定用に、尿と同量の 10%メタリン酸を加えて処理したものを -20°C で保存した。

採尿終了後の Day 29 の午前 9 時～10 時に断頭にて屠殺し、採血および肝臓、副腎を摘出し、重量を測定した。また、血清中のトリグリセライド、肝臓・副腎中のパントテン酸量、尿中の水溶性ビタミン量を測定した。

### 3. 分析方法

#### 肝臓・副腎中のパントテン酸含量

肝臓と副腎を取り出し、乾燥を防ぐために、ラップで覆いをした状態で、37°C の恒温槽内で約 6 時間放置し、臓器中の結合型のパントテン酸を遊離型のパントテン酸にした。その後、各々の臓器重量の 10 倍量の 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  緩衝液（pH 7.0）でホモジネートし、そのホモジネートを 100°C の熱水浴中で 5 分間加熱処理した。そして、熱処理したホモジネートを氷中にて 5 分間冷却した。4°C、10,000 × g で、5 分間遠心分離し、上清を得、この液を総パントテン酸測定用試料とした。定量は、*Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法にて測定した<sup>1)</sup>。

#### 血清中トリグリセライド

血清は、全血 5 ml を室温にて 30 分放置後、

室温にて、800×g、10分間、遠心分離した上清を測定用試料とした。血清中のトリグリセライドは、Triglyceride E テストワコー (GPO・DAOS 法) (和光純薬工業 (株)) にて測定した。

#### 尿中の水溶性ビタミン

##### ①ビタミン B<sub>1</sub>

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のチアミンは木村らによる HPLC 法に従って測定した<sup>2)</sup>。

##### ②ビタミン B<sub>2</sub>

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のリボフラビンは HPLC 法に従って測定した<sup>3)</sup>。

③ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物 4-ピリドキシン酸 (4-PIC)

尿をそのまま測定用試料とした。ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物である 4-PIC の尿中排泄量の測定は HPLC で測定した<sup>4)</sup>。

④ニコチンアミドおよびその異化代謝産物

尿をそのまま測定用試料とした。尿中ニコチンアミド、ニコチンアミドの異化代謝産物である N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) は柴田らによる HPLC 法に従って測定した<sup>5)</sup>。尿中 N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (MNA) は柴田らによる方法に従って測定した<sup>6)</sup>。

##### ⑤パントテン酸

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のパントテン酸は乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) を用いた微生物学的定量法にて測定した<sup>1)</sup>。

##### ⑥葉酸

尿をそのまま測定用試料とした。尿中の葉酸は乳酸菌 *Lactobacillus casei* (ATCC 2773) を用いた微生物定量法を用いて測定

した<sup>7)</sup>。

##### ⑦ビオチン

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のビオチンはビオチン要求株である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法<sup>8)</sup>に従って測定した。

##### ⑧ビタミン C

尿に同量の 10%メタリン酸を加えて処理したものを測定用試料とした。尿中のビタミン C は HPLC 法にて測定した<sup>9)</sup>。

#### 4. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差 (SEM) で表した。有意差検定には Instat software Ver. 2.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。検定は、One-way Analysis of Variance (ANOVA)により、有意差が認められた場合は、Turkey-Kramer Multiple Comparisons Test で個々の群の間の有意差をみた。

#### C. 結果

##### 体重増加量

体重増加量を図 1 に示した。体重増加量は、対照群と三つの試験群間、すべての群間において有意な差異は認められなかった。

##### 飼料摂取量

図 2 には、飼料摂取量を重量当たりとエネルギー当たりで示した。重量では、対照群と 30% 群で有意差がみられた。しかし、エネルギー当たりでは、すべての群間において有意差は認められなかった。

##### 血清中のトリグリセライド含量

図 3 に、血清中のトリグリセライド量を示した。有意差は認められなかった。

##### 肝臓と副腎重量

肝臓重量と副腎重量を表 3 に示したが、脂質摂取量による影響は認められなかった。

##### 肝臓と副腎中の総パントテン酸含量

肝臓と副腎中の総パントテン酸含有量を図

4 に示したが、有意な差異は認められなかった。

#### パントテン酸の尿中排泄量

パントテン酸の尿中排泄量を図 5 に示した。パントテン酸の尿中排泄量は、対照群と比較して、10%群では差異は認められなかったが、20%群・30%群で減少した。

#### B 群ビタミンの尿中排泄量

図 6 に、飼料中の脂質含量がチアミン、リボフラビン、ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物である 4-PIC、葉酸、ビオチン、アスコルビン酸、およびニコチンアミドとその異化代謝産物の合計量である SUM の尿中排泄量におよぼす影響を示した。チアミン、リボフラビン、4-PIC、アスコルビン酸は、脂質摂取量が増大しても、差異は認められなかった。葉酸は対照群と 20%群で、ビオチンは対照群と 30%群で差異が認められた。ニコチンアミドおよびその異化代謝産物の合計量である SUM は脂質摂取量に応じて増大傾向を示した。これは、脂質の摂取量の増大により、肝 aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase 活性が低下することに起因することがすでに明らかにされている<sup>10)</sup>。さらに、培養細胞においても、脂肪細胞に分化する過程で *de novo* ニコチンアミド合成系が亢進することが明らかにされている<sup>11)</sup>。つまり、*de novo* 生合成経路を有するニコチンアミドは脂質の摂取量が増大に応じて、体内で必要なニコチンアミドを供給する経路が応答することを意味している。

尿中の(2-Py+4-Py)/MNA は栄養状態の指標として利用することができるが<sup>12)</sup>、この排泄量比を図 7 に示した。この排泄量比は、脂質の摂取量に応じて低下傾向を示した。

#### D. 考察

脂質摂取量が増加するにしたがい、肝臓中の総パントテン酸量に影響は見られなかったが、尿中のパントテン酸排泄量が減少することを始めて明らかにした。体内でのパントテン酸必要量が高まり、尿中への排泄が減少したものと考えられる。また、他の B 群ビタミンの尿中排泄量では、大きな影響が見られたものは少なかった。葉酸、ビオチンの尿中排泄量が減少した理由は明らかではないが、体内での必要量が高まっている可能性があると考えられる。

これらのことから、今後、食事摂取基準において、脂質摂取量あたりのパントテン酸必要量をヒトを用いて検討していく必要があると思われる。

#### E. 健康危険情報

特記する情報は無い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 口頭発表

①吉田永史奈, 木村尚子, 佐々木隆造, 柴田克己: ラットにおける脂質摂取量とパントテン酸尿中排泄量の関係. 日本栄養食糧学会近畿支部大会, 平成 17 年 10 月 15 日, 兵庫県立大学.

②Yoshida E, Kimura N, Sasaki R, and Shibata K., Relation between lipid intake and urinary excretion of pantothenic acid in rats. International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors. 平成 17 年 11 月 6 日 ~ 11 日, Awajisima, Hyogo, Japan.

#### G. 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

H. 引用文献

1. Skeggs HR and Wright LD, The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26, (1944).
2. Kimura M, Fujita T and Itokawa Y, Liquid chromatographic determination of total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29-31, (1982).
3. Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K, New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628, (1983).
4. Gregory, JF and Kirk, JR, Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883, (1979).
5. Shibata K, Kawada T and Iwai K, Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28, (1988).
6. Shibata K, Ultramicro-determination of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamin*, **61**, 599-604, (1987).
7. Tamura T, Microbiological assay of folates. In *Folic Acid Metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol. 13 (Picciano MF, Stolstad ELR, and Gregory JF, III, eds) pp. 121-137, Wiley-Liss, New York, USA, 1990.
8. Fukui T, Iinura K, Oizumi J and Izumi Y, Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci. Vitaminol*, **40**, 491-498, (1994).
9. Kishida K, Nishimoto Y, and Kojo S, Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **64**, 1505-1507 (1992).
10. Shibata K. and Onodera M, Changes in the conversion rate of tryptophan-nicotinamide according to dietary fat and protein levels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1104-1108 (1992).
11. Fukuwatari T, Doi M, Sugimoto E, Kawada T. and Shibata K, Changes of the pyridine nucleotide levels in adipose differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2565-2568 (2001).
12. 柴田克己, ニコチンアミドの異化代謝産物, *N*<sup>1</sup>-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 (1990).

表 1. 100g 当たりの飼料組成

	対照群	試験群		
	5%コーン油群 (対照群)	10%コーン油群	20%コーン油群	30%コーン油群
カゼイン	20	20	20	20
L-メチオニン	0.2	0.2	0.2	0.2
α-コーンスターチ	46.9	46.9	46.9	46.9
ショ糖	23.4	21.8	18.4	15.1
コーン油	5	10	20	30
ミネラル混合 (AIN-93M MX)	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合 (AIN93-VX)	1	1	1	1

値は、記載のない場合は%で示した。

すべての飼料は 100g 当たり 1.6 mg のパントテン酸カルシウムを含む。

表 2. 100 g 当たりのエネルギー組成

	対照群	試験群		
	5%コーン油群 (対照群)	10%コーン油群	20%コーン油群	30%コーン油群
総エネルギー量 (kcal/100 g)	406.2	431.2	481.2	531.2
脂質エネルギー比 (%)	11	21	37	51

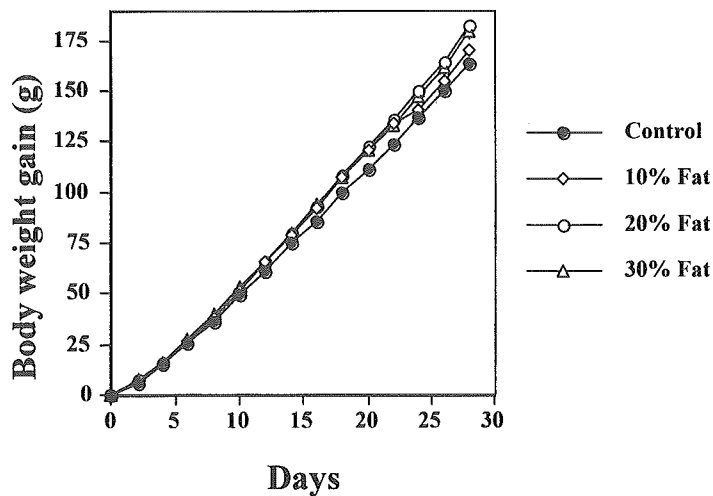


図1. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの体重増加量におよぼす影響  
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は p<0.05 で有意差が認められたことを示す.

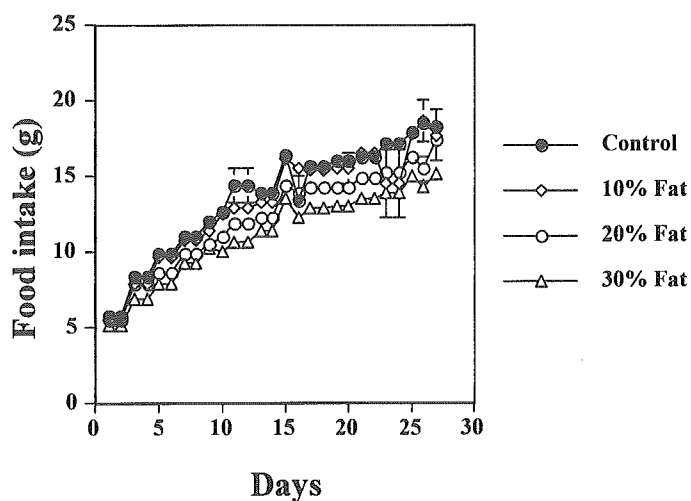


図2. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの飼料摂取量におよぼす影響  
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は p<0.05 で有意差が認められたことを示す.



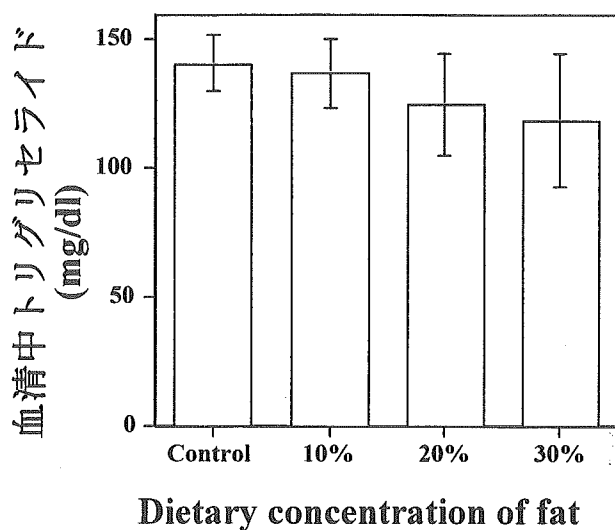
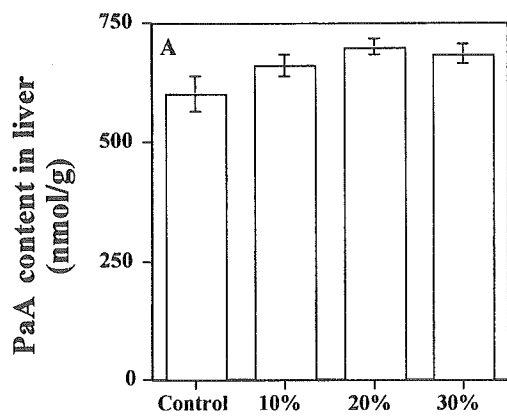


図3. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの血清中トリグリセライド量におよぼす影響  
値は平均値±SEMで示した (n=5).

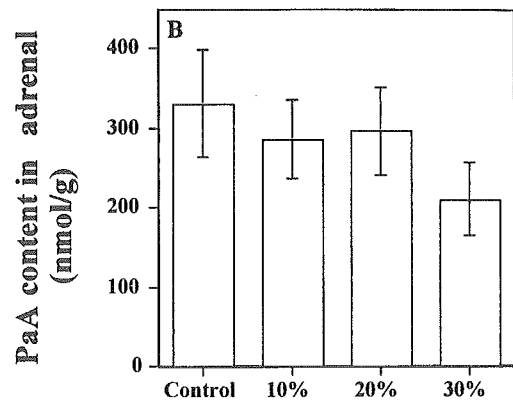
表3. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの肝臓重量と副腎重量におよぼす影響

	Control 群		Test 群	
	5%	10%	20%	30%
肝臓 (g)	9.381±0.11	9.05±0.62	9.22±0.16	8.68±0.37
副腎 (g)	0.043±0.01	0.046±0.007	0.042±0.007	0.033±0.006

値は平均値±SEMで示した (n=5).



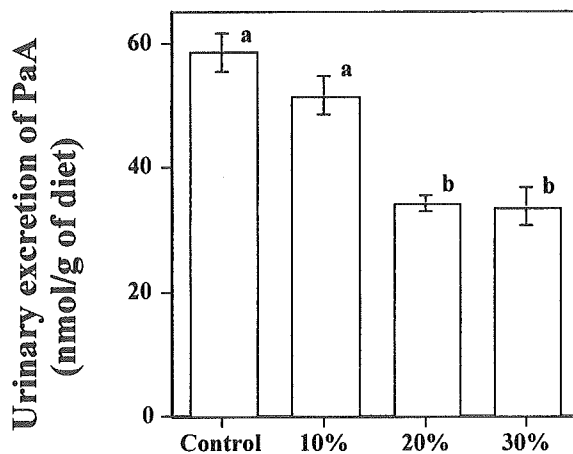
Dietary concentration of fat



Dietary concentration of fat

図4. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの肝臓中総パントテン酸量 (A) と副腎中総パントテン酸量 (B) におよぼす影響

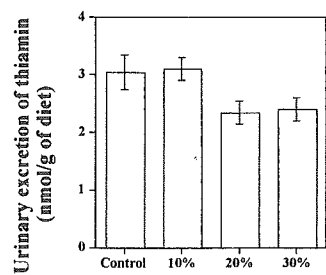
値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は p<0.05 で有意差が認められたことを示す.



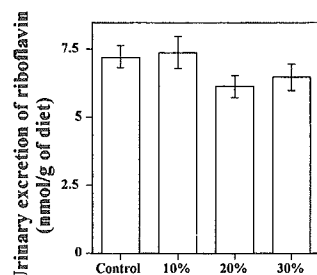
Dietary concentration of fat

図5. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの尿中のパントテン酸排泄量におよぼす影響

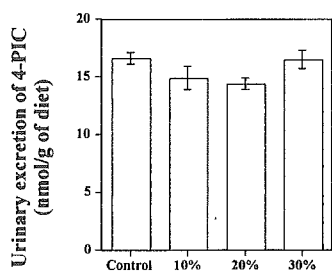
値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は p<0.05 で有意差が認められたことを示す.



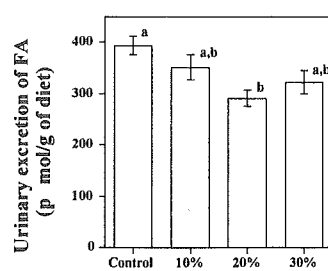
Dietary concentration of fat



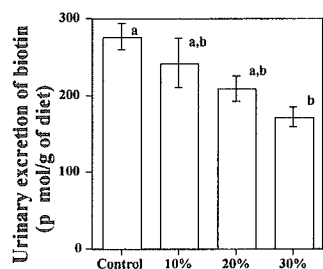
Dietary concentration of fat



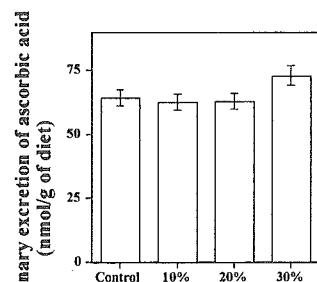
Dietary concentration of fat



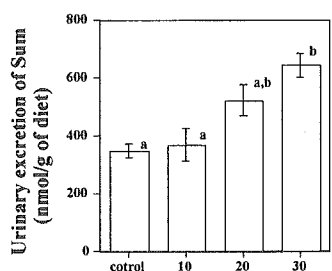
Dietary concentration of fat



Dietary concentration of fat



Dietary concentration of fat



Dietary concentration of fat (%)

図 6. 飼料中の脂質含量が幼若ラットの尿中の水溶性ビタミン排泄量におよぼす影響  
値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は  $p<0.05$  で有意差が認められたことを示す.

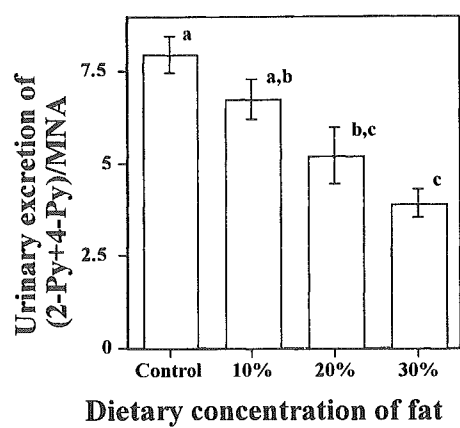


図7. 飼料中の脂質含量が尿中の(2-Py+4-Py)/MNA 比におよぼす影響  
 値は平均値±SEM で示した (n=5). 異なる添え字は  $p < 0.05$  で有意差が認められたことを示す.

平成 17 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

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

1. 日本人の食事摂取基準の策定を目的とした新規母乳中脂溶性ビタミン濃度  
一定量法の開発と脂溶性ビタミンの潜在性欠乏に関する評価

分担研究者 岡野登志夫 神戸薬科大学衛生化学研究室 教授

研究協力者 須原義智, 鎌尾まや, 津川尚子 神戸薬科大学衛生化学研究室

#### 研究要旨

日本人の脂溶性ビタミンの栄養状態と食事摂取量との関係を示す栄養調査研究は少なく、食事摂取基準の策定には欧米のデータが中心に用いられている。この現状に鑑み、日本人の栄養調査データを集積することを目的として、正確かつ高精度の血中及び母乳中脂溶性ビタミン濃度の微量定量法を開発した。今年度は、昨年度に確立した LC-APCI/MS/MS による血中ビタミン K 及び 25-ヒドロキシビタミン D 濃度の測定法を発展させ、血中、母乳中脂溶性ビタミンの一斉定量法を確立した。一方、成人を対象とした脂溶性ビタミンの潜在性欠乏評価の一環として、骨に対するビタミン K (VK) の必要量を評価した。血中 VK 濃度と骨代謝における VK 栄養マーカーである非グラ化オステオカルシン (ucOC) 濃度を測定し、ucOC 濃度は VK の不足マーカーとして利用できることを確認するとともに、骨における VK 要求性が加齢的に高まることを示唆する結果を得た。

## 1. LC-APCI/MS/MS 法による血中脂溶性ビタミン濃度定量法の確立

脂溶性ビタミンの栄養調査を目的として、我々が合成した重水素あるいは重酸素標識化合物を内部標準物質とする血漿中脂溶性ビタミンの一斉定量法を確立した。

### 【定量法】

ヒト血漿あるいは血清 0.5mL を褐色のスクリーコック付遠沈管にとり、内部標準物質として  $d_6$ -all-*trans*-retinol エタノール溶液<sup>1)</sup> 25 $\mu$ L 及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質を含むエタノール溶液<sup>2)</sup> 25 $\mu$ L、蒸留水 0.5mL、ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 3.0mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000rpm で 5 分間遠心分離した。有機層 2.5mL を褐色試験管にとり、ロータリーエバポレーターで乾固した後、得られた残渣をエタノール 200 $\mu$ L に溶解し、50 $\mu$ L を以下の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

### <HPLC 条件>

ポンプ：LC-10AD (島津製作所社製)

オートインジェクター：SIL-10AD (島津製作所社製)

カラム：CAPCEL PAK C<sub>18</sub> UG120

(4.6 mm i.d.x250 mm、5  $\mu$ m、資生堂社製)

移動相：(A) メタノール：水 (90:10, v/v)

(B) アセトニトリル

0-10min (A) 100 %

10-40min (B) 0 $\rightarrow$ 90 %のグラジエント

40-100 min (A) : (B) =10 : 90

流速：1.0mL/min.

### <APCI-MS/MS 装置及び MS 検出条件>

装置：API-3000

(アプライドバイオシステムズ社製)

### MS 検出条件：

Precursor ion/product ion (*m/z*)

all-*trans*-retinol (*m/z* : 269.1/213.4)

$\beta$ -carotene (*m/z* : 537.6/177.1)

vitamin D<sub>3</sub> (*m/z* : 385.3/259.4)

25(OH)D<sub>3</sub> (*m/z* : 383.3/229.3)

$\alpha$ -tocopherol (*m/z* : 430.4/165.1)

PK (*m/z* : 451.5/187.1)

MK-4 (*m/z* : 445.5/187.3)

MK-7 (*m/z* : 649.7/187.1)

$d_6$ -all-*trans*-retinol (*m/z* : 275.2/192.4)

$d_6$ - $\beta$ -carotene (*m/z* : 543.6/180.1)

$d_7$ -vitamin D<sub>3</sub> (*m/z* : 392.4/266.5)

$d_6$ -25(OH)D<sub>3</sub> (*m/z* : 389.4/229.1)

$d_6$ - $\alpha$ -tocopherol (*m/z* : 436.5/171.1)

<sup>18</sup>O-PK (*m/z* : 455.4/191.1)

<sup>18</sup>O-MK-4 (*m/z* : 449.4/191.1)

<sup>18</sup>O-MK-7 (*m/z* : 653.7/191.1)

各脂溶性ビタミンの定量には各脂溶性ビタミン (5、20、100、500、2500、12500、62500 ng/mL) 及びその内部標準物質 (500ng/mL) を含む標準溶液を用いた。内部標準物質と測定対象脂溶性ビタミンの濃度比に対してピーク面積比をプロットした検量線を作成し、以下の計算式より濃度を算出した。

血漿 (血清) 中脂溶性ビタミン濃度 (ng/mL)

$$=RS/V$$

R : 検量線より得られた内部標準物質に対する測定対象脂溶性ビタミンの濃度比

S : 内部標準物質の添加量 (25ng)

V : 血漿 (血清) 量 (0.5mL)

1)  $d_6$ -all-*trans*-retinol (図 1) エタノール溶液：用時、 $d_6$ -all-*trans*-retinol acetate をアルカリけ

ん化して調製した。ヘキサン：酢酸エチル（9：1）抽出液より得られた残渣を2-プロパノールに溶解し、325nmの吸光度（ $A_{325\text{ nm}}$ ）を測定した。以下の式に基づき  $d_6$ -all-trans-retinol 濃度を計算し、1 $\mu\text{g/mL}$ のエタノール溶液を調製した。また、蛍光検出 HPLC により純度検定をおこなった。

$$d_6\text{-all-trans-retinol 濃度 } (\mu\text{g/mL}) \\ = A_{325\text{ nm}} \times 549/100$$

2) その他の内部標準物質を含むエタノール溶液： $d_6$ - $\beta$ -carotene、 $d_7$ -vitamin  $D_3$ 、 $d_6$ -25(OH) $D_3$ 、 $d_6$ - $\alpha$ -tocopherol、 $^{18}\text{O}$ -PK、 $^{18}\text{O}$ -MK-4 及び  $^{18}\text{O}$ -MK-7（図1）をそれぞれ1 $\mu\text{g/mL}$ となるようエタノールに溶解した。

#### 【定量精度の確認】

図2に示すように、標準物質混合溶液ならびに血漿差試料において、全ての測定対象脂溶性ビタミンは単一ピークとして検出され、一斉定量が可能であることが確認された。標準溶液に対して作成した検量線は、全ての測定対象脂溶性ビタミンにおいて、0.25 から3125ngの範囲で直線性を示した。

検出限界は各化合物間でばらつきがあるものの、十分な感度が得られた（表1）。また、我々が精度管理に使用しているプール血漿に all-trans-retinol 250ng、 $\beta$ -carotene 150ng、vitamin  $D_3$  2ng、25(OH) $D_3$  10ng、 $\alpha$ -tocopherol 6.5 $\mu\text{g}$ 、PK 0.75ng、MK-4 1ng、MK-7 4ng を添加して添加回収率を求めたところ、表1に示すように良好な回収率が得られた。従って、本法における脂溶性ビタミンの定量は十分な真度であると判断した。プール血漿を試料とした場合の同時再現性、日差再現性について検討したところ、vitamin  $D_3$  を除いて変動係数10%以下と良好な値を示し、十分な測定精度が達成されていると判断した（表2）。プ

ール血漿の vitamin  $D_3$  測定値の日差変動が大きくなった理由として、血漿中 vitamin  $D_3$  濃度が検出限界付近の低値であったことが考えられる。

さらに、プール血漿の各脂溶性ビタミン濃度を本法及び従来法（蛍光検出 HPLC 法、可視検出 HPLC 法、化学発光法）で測定し、得られた値を比較した。その結果、表3に示すように、本法及び従来法の定量結果はよく一致した。従って、本法は真度、精度及び特異性に優れ、且つ各脂溶性ビタミン濃度を一斉定量できる方法であるといえる。

## 2. LC-APCI/MS/MS 法による母乳中脂溶性ビタミン濃度定量法の確立

前述の LC-APCI/MS/MS 法による血漿中脂溶性ビタミン濃度定量法を、母乳中脂溶性ビタミンの定量に応用した。

#### 【定量法】

母乳試料は解凍後、超音波処理をおこない均質化した。続いて、ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンはアルカリけん化法で、アルカリに不安定なビタミン K はリパーゼ消化法で抽出した。

#### (1) ビタミン K 以外の脂溶性ビタミンの抽出（アルカリけん化法）

母乳 20.0mL を褐色の共栓付フラスコにとり、内部標準物質として  $d_6$ -all-trans-retinol エタノール溶液 100 $\mu\text{L}$  及び重水素あるいは重酸素ラベル化したその他の内部標準物質を含むエタノール溶液 100 $\mu\text{L}$ 、1%塩化ナトリウム溶液 12mL、7%ピロガロール・エタノール溶液（w/v）40mL、60%水酸化カリウム溶液 20mL を加え、70 $^{\circ}\text{C}$ で60分間、加熱けん化した。室温まで冷却後、分液ろうとに移し、

1%塩化ナトリウム溶液 76mL、ヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 60mL を加えて振とうし、有機層を取り分けた。水層に再びヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 60mL を加えて振とうし、有機層を先の有機層に合わせた後、洗液がフェノールフタレイン試液で着色しなくなるまで蒸留水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過しながら褐色ナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで乾固した。残渣をヘキサン：酢酸エチル (9 : 1, v/v) 3mL に溶解し、褐色試験管に移した後、再びロータリーエバポレーターで乾固した。残渣をエタノール 100 $\mu$ L に溶解し、50 $\mu$ L を前述の条件の LC-APCI/MS/MS に適用した。

#### (2) ビタミン K の抽出 (リパーゼ消化法)

母乳 3.0mL を褐色のスクリュウコック付遠沈管にとり、内部標準物質を含むエタノール溶液 100 $\mu$ L、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.7) 12mL、リパーゼ (ブタすい臓製、ナカライテスク社製) 0.3g を加え、混合した後、37 $^{\circ}$ C で 90 分間攪拌した。エタノール 12mL を加えた後、超音波処理をおこない、ヘキサン 12mL を加えた。ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 10mL を褐色ナス型フラスコに移した。残った水層にヘキサン 12mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、3,000rpm で 5 分間遠心分離し、ヘキサン層 12mL をナス型フラスコにあわせた。ヘキサン層をロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣をヘキサン 3mL に溶解し、あらかじめヘキサン 10mL で洗浄した Sep-Pak Silica カートリッジ (Waters 社製) に負荷した。ヘキサン：ジエチルエーテル (97 : 3, v/v) 5.0mL により溶出させたビタミン K 画分を、ロータリーエバポレーターで乾固した。得られた残渣をエタノール 200 $\mu$ L に溶解し、50 $\mu$ L を前述の条件の

LC-APCI/MS/MS に適用した。

#### 【定量精度の確認】

7名の健常授乳婦より提供された母乳を混合して調製したプール母乳を用いて、添加回収率及び同時再現性を検討した。

プール母乳 20.0mL に all-*trans*-retinol 20 $\mu$ g、 $\beta$ -carotene 0.6 $\mu$ g、vitamin D<sub>3</sub> 20ng、25(OH)D<sub>3</sub> 20ng、 $\alpha$ -tocopherol 30 $\mu$ g、PK 30ng、MK-4 20ng、MK-7 10ng を添加して添加回収率を求めたところ、表 4 に示すように良好な回収率が得られた。従って、本法における脂溶性ビタミンの定量は十分な真度を有すると判断した。また、同時再現性試験における変動係数は 10% 以下と良好な値を示し、十分な測定精度が達成されていると判断した。

### 3. 日本人母乳試料中脂溶性ビタミン濃度

現在までに得られた母乳試料について、脂溶性ビタミン濃度を測定した。

#### 【試料背景及び推定摂取量の計算】

母乳試料の背景 (n=17) は以下のとおりである。

授乳婦年齢 : 29.7 $\pm$ 5.0 才

母乳採取時期 : 出産後 2.2 $\pm$ 1.5 ヶ月

得られた母乳中脂溶性ビタミン濃度より、推定摂取量を以下の式にて算出した。

推定摂取量=

母乳中脂溶性ビタミン濃度 $\times$ 平均哺乳量  
(780mL)

ビタミン A 推定摂取量はレチノール当量 (RE) とした。

レチノール当量 (RE)

= 1 $\mu$ g all-*trans*-retinol 12 $\mu$ g  $\beta$ -carotene



ビタミン D 推定摂取量は 25(OH)D<sub>3</sub> のビタミン D 換算係数を 5 として算出した。

ビタミン D 推定摂取量=

vitamin D<sub>3</sub> 推定摂取量+5×25(OH)D<sub>3</sub> 推定摂取量

また、ビタミン K 推定摂取量は MK-7 を MK-4 換算重量として合算した。

ビタミン K 推定摂取量=

PK 推定摂取量+MK-4 推定摂取量+  
MK-7 推定摂取量×444.7/649

444.7 : MK-4 の分子量

649 : MK-7 の分子量

### 【結果】

出産後 0～5 ヶ月の授乳婦より提供された母乳中脂溶性ビタミン濃度及び推定摂取量を表 5 に示す。母乳中脂溶性ビタミン濃度より算出した推定摂取量は、ビタミン A、E、K では 2005 年版食事摂取基準値 (0～5 月、目安量) をやや上回っていたが、ビタミン D については約 40%程度と低かった。現在のところ、試料数が少なく、さらなる検討が必要であるが、実際の母乳の摂取では現行の基準値を満たすことが困難である可能性が示唆された。また、採血の協力が得られた対象者について血漿中及び母乳中脂溶性ビタミン濃度の相関を調べた結果、ビタミン D において有意な相関が認められた (図 6)。

今後、例数を増やして同様の検討を行うとともに、授乳婦の食事調査を実施し、脂溶性ビタミン摂取量と母乳中あるいは血漿中濃度の関係についても調べる予定である。

## 4. 脂溶性ビタミンに関する潜在性欠乏の評価-骨に対するビタミン K の必要量の評価<sup>a)</sup>

### 【目的】

ビタミン K (以下、VK) は多くの血液凝

固因子の合成において重要な役割を持つことが知られる。また、VK はオステオカルシンやマトリックスグラ蛋白あるいはプロテイン S のような VK 依存性蛋白質を  $\gamma$ -カルボキシル化することによって骨代謝において重要な役割を果たす。現在、乳児の場合を除き、出血を伴うような VK 欠乏患者はほとんど見られない。しかし、骨に対して低 VK 摂取が閉経後女性の大腿骨頸部骨折のリスクを増大させるとともに、大腿骨、脊椎における低 BMD と関連があると報告されている。このことは、骨の健康維持に必要な VK 量は血液凝固に必要な量よりも多いことを示唆するものである。わが国では骨粗鬆症治療にビタミン K<sub>2</sub> が使用されているが、フィロキノン(PK)やメナキノン (MK-4, MK-7) を中心とする VK 栄養が骨粗鬆症予防に果たす役割については十分な検討がなされていない。血液凝固に関連する VK 不足のマーカーには PIVKII (protein induced by vitamin K absence II) が、骨に対する VK 不足マーカーには非カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) が用いられる。そこで、骨粗鬆症予防における VK の栄養効果を検討するため、30～49 歳、50～69 歳、70 歳以上の 3 年齢層の日本人成人女性を対象に血中 PK 及び MK-4、MK-7 濃度を測定し、ucOC 濃度を測定するとともに骨代謝関連指標との関連について調査した。

### 【方法】

対象者 : 30-88 歳までの日本人女性 396 名 (30-49 歳 52 名、50-69 歳 208 名、70 歳以上 136 名)。平均年齢 63 歳。骨粗鬆症以外の骨代謝疾患をもつ女性及び活性型ビタミン D、VK、VK 拮抗薬、エストロゲン、bisphosphonate、ステロイドなどの骨代謝関連薬を服用している対象者は除外した。

測定項目 : 血中 PK、MK-4、MK-7 濃度、PTH、

ucOC、intactOC、Ca、P、BAP 濃度、Alp 活性、尿中 NTx/Cr、DPD/Cr、U-Ca/Cr、BMI、L<sub>2-4</sub> BMD 及び椎体骨骨折頻度。統計解析には、JMP 5.0.1 J を用いた。

#### 【結果及び考察】

対象者の血漿中 PK、MK-4、および MK-7 濃度は平均それぞれ 1.57、0.10、6.47ng/mL であった。血中 ucOC 濃度及び ucOC/intactOC 比は、血中 PK、MK-7 濃度と有意に逆相関したが、MK-4 濃度との相関はみられなかった (表 6)。MK-4 濃度が ucOC 濃度と有意な関係を示さなかったのは、通常の栄養レベルでの血中 MK-4 濃度が非常に低いことが一因と考えられる。また、骨吸収マーカーである尿中 DPD 濃度が、PK 濃度と有意な負の相関を示した。ucOC 濃度や尿中 DPD 濃度は、年齢とともに増加する因子であり、PK、MK-7 はともに年齢と有意な負相関を示している。このことから、PK、MK-7 濃度と ucOC、尿中 DPD の関係に、年齢が交絡因子として関与する可能性が考えられるため、年齢、BMI、コレステロール、トリアシルグリセロール、PK、MK-4、MK-7 を予測因子として、前向き段階的重回帰分析を行い、ucOC、ucOC/intactOC 比、DPD の独立影響因子を求めた。その結果、ucOC、ucOC/intactOC 比に対しては年齢、PK、MK-7 濃度が独立因子として関与し、尿中 DPD に対しては年齢、PK 濃度が関与することが明らかになった (表 7)。さらに、年齢層別に PK 濃度、MK-7 濃度と ucOC/intactOC 比の関係を評価した結果、図 4 に示すように、ucOC/intactOC 比を十分に低下させるために必要な PK、MK-7 濃度は加齢とともに上昇することが明らかになった。また、対象者を PK 濃度と ucOC 濃度の中央値 (PK: 1.18ng/mL,

ucOC:3.73ng/mL) で 4 群 (I 群:低 PK 高 ucOC 群、II 群:低 PK 低 ucOC 群、III 群:高 PK 高 ucOC 群、IV 群:高 PK 低 ucOC 群) に分割して骨折有病率を比較した結果、BMD、年齢とは無関係に脊椎骨折有病率は I 群から IV 群に向けて低下した。IV 群に対する I 群、II 群の脊椎骨折のオッズ比は各々 2.9、2.2 で有意に高く、K の栄養状態が低下すると骨折の危険性が高くなることが示唆された。

以上の結果から、血液凝固を指標とする欠乏症状を示さない場合においても、骨代謝における VK の潜在性欠乏が存在する可能性は高く、VK の栄養状態が骨折に関与する可能性が強く示唆された。また、高齢者では骨における VK 要求性が高まる可能性が示唆された。

#### 【投稿論文】

- a) Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T. "Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin" *Am J Clin Nutr.* 2006, 83, 380-6.



表1 検出限界とプール血漿における添加回収率

	Retinol	$\beta$ -carotene	Vitamin D <sub>3</sub>	25(OH)D <sub>3</sub>
検出限界(pg)	500	250	250	250
添加回収率				
Mean $\pm$ S.D.(%)	96.34 $\pm$ 4.19	92.86 $\pm$ 4.74	96.90 $\pm$ 7.74	105.98 $\pm$ 5.42
C.V.(%)	4.34	5.10	7.98	5.12

	$\alpha$ -tocopherol	PK	MK-4	MK-7
検出限界(pg)	100	25	25	50
添加回収率				
Mean $\pm$ S.D.(%)	109.7 $\pm$ 17.37	112.14 $\pm$ 10.76	101.21 $\pm$ 6.61	101.85 $\pm$ 5.10
C.V.(%)	6.72	9.60	6.53	5.00

表2 プール血漿における測定精度

	Retinol ( $\mu$ g/dL)	$\beta$ -carotene ( $\mu$ g/dL)	Vitamin D <sub>3</sub> (ng/mL)	25(OH)D <sub>3</sub> (ng/mL)
同時再現性				
Mean $\pm$ S.D.	55.52 $\pm$ 1.63	28.46 $\pm$ 2.27	0.33 $\pm$ 0.03	22.67 $\pm$ 1.49
C.V.(%)	2.94	7.97	8.81	6.56
日差再現性				
Mean $\pm$ S.D.	60.19 $\pm$ 3.29	29.80 $\pm$ 1.71	0.33 $\pm$ 0.06	22.67 $\pm$ 1.01
C.V.(%)	5.47	5.73	17.20	4.47

	$\alpha$ -tocopherol (mg/mL)	PK (ng/mL)	MK-4 (ng/mL)	MK-7 (ng/mL)
同時再現性				
Mean $\pm$ S.D.	13.11 $\pm$ 0.70	1.77 $\pm$ 0.15	1.92 $\pm$ 0.11	7.49 $\pm$ 0.44
C.V.(%)	5.33	8.45	5.88	5.86
日差再現性				
Mean $\pm$ S.D.	12.68 $\pm$ 0.47	1.91 $\pm$ 0.18	2.01 $\pm$ 0.10	7.01 $\pm$ 0.68
C.V.(%)	3.69	9.28	4.76	9.68