

平成18年度厚生労働科学研究費補助金  
循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柴田 克己

平成19(2007)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告書	001
1. 平成 18 年度の成果の要約	002
柴田克己	
II. 主任研究者の報告書	015
1. 高脂肪食がパントテン酸の必要量におよぼす影響	016
柴田克己	
2. ビオチンの大量摂取がラットに与える影響	038
柴田克己	
3. 尿中ビタミン B <sub>12</sub> 排泄量におよぼす要因	058
柴田克己	
4. 成人男性における水溶性ビタミン摂取量と尿中および血中ビタミンレベルとの 関係	076
柴田克己, 福渡努	
5. 絶食が水溶性ビタミンの尿中排泄量におよぼす影響	092
柴田克己	
6. 水溶性ビタミンの尿中排泄量を指標とした水溶性ビタミンの栄養状態の評価の試み	106
柴田克己	
7. 日本人の離乳開始前の哺乳量に関する検討	142
柴田克己, 廣瀬潤子, 成田宏史, 長尾早枝子, 水島香苗	
8. 乳児におけるビタミン必要量の精度向上に関する研究	152
柴田克己	

<b>Ⅲ. 分担研究者の報告書</b>	169
1. ビタミンB <sub>2</sub> 栄養の低下がビタミンB <sub>6</sub> 栄養に及ぼす影響について	170
早川享志	
2. ビタミンB <sub>12</sub> の栄養評価に関する基礎的研究	181
渡辺文雄, 宮本恵美	
3. 食事葉酸の必要量に関する基礎的検討	196
梅垣敬三	
4. 健常成人女性におけるビオチンの吸収と排泄についての検討	211
渡邊敏明, 榎原周平, 福井徹	
5. 健常成人女性におけるビオチンの出納試験についての検討	220
渡邊敏明, 榎原周平, 福井徹	
6. トータルダイエット調査による水溶性ビタミンの摂取量についての検討	228
渡邊敏明, 榎原周平, 福井徹	
7. カロテノイドの必要量	239
寺尾純二, 板坂東紀子	
8. 日本人の食事摂取基準の策定を目的とした血中および母乳中脂溶性ビタミン濃度の定量と脂溶性ビタミンの潜在性欠乏に関する評価	246
岡野 登志夫, 鎌尾まや, 須原義智, 津川尚子	
9. 高齢者における脂溶性ビタミン (ビタミンD、ビタミンK) 欠乏に関する検討	292
田中清, 木戸詔子	
10. 食物アレルギーの発症・進展に対する $\alpha$ -トコフェロールおよび $\gamma$ -トコトリエノール同時投与の影響 -オボアルブミン誘発食物アレルギーモデルマウスを用いての検討-	302
森口覚	
11. 高 $\alpha$ -トコフェロールあるいは高 $\gamma$ -トコフェロール摂取に伴うビタミンEの血中濃度変化と運動トレーニングの影響	313
森口覚	
12. トリプトファン過剰摂取の影響に関する研究	320
福岡伸一	
13. 母乳分泌における脂溶性ビタミンの細胞内輸送機構の解析	323
玉井浩	
<b>Ⅳ. 研究協力者の報告書</b>	327
1. 母乳中の総たんぱく質, IgA 含量の変動	328
成田宏史, 廣瀬潤子, 長尾早枝子	

<b>V. 講演会の開催報告書</b>	339
1. ビタミンの現在・過去・未来と食事摂取基準 -欠乏症の克服から生活習慣病の予防へ-	340
早川享志, 柴田克己	
2. ビタミンを正しく摂ろう	397
渡邊敏明, 柴田克己	
3. 健康の維持・増進と食事	444
柴田克己, 福井富穂, 福渡努, 廣瀬潤子	
4. 健康に過ごすための提言 -食生活を基盤にして-	460
柴田克己, 福井富穂, 福渡努, 廣瀬潤子	
<b>VI. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	481
<b>VII. 研究成果の刊行物・別刷</b>	487

# I. 総括研究報告書

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

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

平成 18 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

- 食品中のビオチン含量の測定 とビオチン摂取量に関する研究
- 哺乳量と母乳中のビタミン含量に関する研究
- 尿を利用した水溶性ビタミン栄養状態の判定に関する研究
- ビタミン B<sub>2</sub>-ビタミン B<sub>6</sub>相互作用 がビタミン B<sub>2</sub> と B<sub>6</sub> の必要量におよぼす影響
- 母乳中のビタミン E 濃度を制御する因子に関する研究
- 酸化ストレスがビタミンの必要量におよぼす影響
- 脂肪摂取がパントテン酸必要量におよぼす研究
- ビオチンの上限量に関する研究
- 高齢者のビタミン B<sub>12</sub>, 葉酸, ビタミン D, E 必要量に関する研究
- 授乳婦の血清中の脂溶性ビタミン含量と母乳中の脂溶性ビタミン含量との関係に関する研究
- 普及活動を 4 回実施

## A. 目的

目的は、①厚生労働省策定「日本人の食事摂取基準(2005年版)」作業において懸案事項となった課題、特に社会的に関心の高いビタミンを中心とした課題に取り組み、解決し、2010年度の改定作業につなげること、②国民への「日本人の食事摂取基準(2005年版)」およびビタミンに対する正確な知識を普及させること、である。

今年は3年計画の最終年度の3年目である。

## B. 成果

### 【食事摂取基準ービタミン必要量ーの精度向上】

1. ビオチンについては、日本食品標準成分表に掲載されていないために、目安量が策定されても十分に活用されていない。H16~18年度の総計で327品目を分析し、これらの値を利用してビオチン摂取量を算出できる新しい食事調査法を確立した。

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いまだ記載されていない栄養素である。また、わが国のビオチン摂取量に関しても、データはほとんど存在しない。そこで、本研究では、日本人におけるビオチン摂取量に関する最近の報告の中から、我々の前報および東京都TDSでのビオチン摂取量の推定値(45 $\mu$ g)を利用して、ビオチン摂取量についての検討をおこなった。我々の前報に関しては、これまでの食品101品目の分析に加えて、新たに136品目の分析をおこなった。これらの食品を98食品群に分類し、ビオチン分析値と国民栄養調査結果

(2002年度版)を利用して、日本人における1日あたりのビオチン摂取量を算出した。その結果、ビオチン摂取量は58.4 $\mu$ gと推定された。一方、東京都TDSから算出した各食品群のビオチン含量を、2002年度国民栄養調査を利用して再計算したところ51 $\mu$ gであり、本研究値と一致した。これらの方法は、ビオチンのように食品中の含量が未知である栄養素の摂取量の推定において、有効な手段であることが期待される。また、TDSは化学物質だけでなく、ビタミンやミネラルなどの微量栄養素の摂取量の推定においても利用が可能であるといえる。結論として、日本人成人のビオチン摂取量は、50 $\mu$ g/日程度であると結論した。

2. 乳児の食事摂取基準値の精度を高めるために、調査地域の拡大を行い、完全母乳の乳児18名の0ヶ月~5ヶ月目までの一日哺乳量を調査した。昨年度までに得られたデータと合わせて解析した結果、乳児(0~5ヶ月)の哺乳量は0.8L/日であることを明らかにした。昨年度に母乳中のビタミン含量を測定したが、2005年度版で採用されたビタミン含量と大きく異なるビタミンがあった。それは、ビタミンB<sub>6</sub>とB<sub>12</sub>であった。そこで、北海道、関東、中国、九州地方の生後5ヶ月目までの乳児をもつ母親(約100名)から母乳を採取し、ビタミンB<sub>6</sub>とB<sub>12</sub>含量の測定を行った。その結果、ビタミンB<sub>6</sub>による差異は定量方法による差異であり、微生物的定量方法では低くでるこ

とが明らかとなった。ビタミンB<sub>12</sub>に関しては、原因が特定できなかったが、保存方法による違いが疑われた。さらに、哺乳量および母乳中の各成分に関する文献収集を行い、乳児および授乳婦の食事摂取基準策定のための基礎資料を収集した。

3. 母乳は子供の急速な成長と発達にとって重要であり、十分なエネルギーと必須栄養素を供給する。感染予防物質・細胞・ホルモン・酵素・成長因子・結合タンパク質など多くの物質を含んでいる。脂溶性ビタミン群も同様に母乳中に含まれ、授乳を通じて乳児に供給される。近年、母乳分泌のメカニズムは詳細に解明されつつある。ビタミンEは、肝細胞内における $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質 ( $\alpha$ -TTP:  $\alpha$ -tocopherol transfer protein) が同定され、細胞内輸送機構が明らかにされている。しかし乳腺細胞においてはまだ検討されていない。

初乳中のビタミンE濃度は、成熟乳および母体血液中と比較し、高値であることが知られている。すなわち乳腺細胞においては、ビタミンEを積極的に細胞外に輸送する機構の存在が考えられる。そこで今回我々は、乳腺細胞においても $\alpha$ -TTP遺伝子が存在することを確認し、その発現調節機構を解明することを試みた。

実験方法としては、ヒト培養細胞であるIshikawa cell (子宮内膜腺癌)、FLC-5 (肝癌)、MCF-10 (乳腺線維嚢胞) を用いて、添加実験を行った。添加リガンドとして、成長因子・ホルモン・ビタミン・脂溶性リガンドを用いた。添加24時間後の培養細胞からRNAを抽出し、real-time RT PCR法を用いて、 $\alpha$ -TTP遺伝子発現を検討した。その結果、各培養細胞において、

22 (R) hydroxycholesterol (22R HC) 添加後、 $\alpha$ -TTP遺伝子発現が有意に上昇した ( $p<0.05$ )。この発現の上昇は濃度依存的であった。またヒト初代肝臓培養細胞でも、22R HCにより $\alpha$ -TTP遺伝子発現が上昇した ( $p<0.05$ )。22R HCは、コレステロール代謝に関与している核内受容体LXR (liver X receptor) のリガンドである。

4. 栄養士養成関連施設に通う学生約700名より採取した1日尿に含まれる水溶性ビタミン量を測定し、食事調査結果と比較することにより、尿中水溶性ビタミン量を指標とした水溶性ビタミン栄養状態の評価を試みた。その結果、従来行われていたビタミン摂取量と必要量 (推奨量あるいは目安量) との比較による食品側の情報のみによる栄養評価よりも、尿中の含量という生体側の情報を基にして栄養評価を行った方が、食事調査という被験者に負担をかける方法よりも、験者に負担がかかる方法の方が、より精度が高いため、正しい栄養評価が行えることが明らかとなった。この栄養評価方法を普及させるためには、尿中のビタミンを測定できる施設の開設が必要である。

5. パントテン酸は脂質代謝に関与するため、脂肪摂取量とパントテン酸の必要量は関係があると考えられているが、この関係を定量的に示す具体的な情報はない。そこで、脂肪摂取量とパントテン酸の必要量の関係を調べるため、まず、

脂肪摂取量の増加が尿中へのパントテン酸排泄量の低下をもたらすか否かを調べた。その結果、予想通り、脂肪摂取量の増加がパントテン酸の尿中排泄量を低下させた。この現象は、必要量の増加を示唆するデータであった。そこで、このことを強固にするために、3週齢のWistar系雄ラットを用いてさらに実験を行った。飼料中のパントテン酸量を0%、0.00037%、0.00074%、0.00147%（対照群）とし、4週間飼育し、体重増加量などを指標として5%脂肪食（通常食）におけるパントテン酸の必要量を求めた。その結果、5%脂肪食（通常食）におけるパントテン酸の必要量は0.00037%程度であることが分かった。そこで、次に、パントテン酸量を0.00037%と一定にした飼料に、5%あるいは30%となるように脂肪を加えた飼料を与え、4週間飼育した。最終日の血液、肝臓、副腎、尿中のパントテン酸量を測定し、高脂肪食がパントテン酸の必要量に影響をおよぼすか検討した。その結果、30%脂肪食群の体重増加量、血液、肝臓、副腎中のパントテン酸量が低値を示した。これは、30%脂肪食でパントテン酸の栄養状態が悪化したことを示している。これらより、高脂肪食がパントテン酸の必要量を高めることが明らかとなった。

6. 実験動物を用い、ビオチンの上限量策定のための基礎実験をおこない、上限量の策定が必要であることを明らかにした。ビオチンの添加群として0.04%、0.08%、0.1%、0.2%となるようにし、同様の実験を行った。飼料摂取量は、対照群と比較して、0.2%添加群で有意に低値を示した。体重増加量は、対照群と0.04%群との間に差異は認められなかったが、0.08%以

上では有意に低い値であった。本実験結果から、0.04%添加群を毒性が見られなかった最大飼料摂取量、0.08%添加群を毒性が見られた最小飼料摂取量とした。これより、ラットにおけるビオチンのNOAEL (no-observed-adverse-effect-level) は38.4 mg/kg body weight、LOAEL (lowest-observed-adverse-effect-level) は79.2 mg/kg body weightとなった。

ビオチンの毒性発現量は、他の水溶性ビタミンと比較して、低量であり、かつ体内に蓄積していた。そこで、肝臓中に蓄積したビオチンの形態を調べた結果、約40%がタンパク質と結合していた。組織中に蓄積したビオチンが何らかのタンパク質と共有結合していると考えられた。最近、ヒストンのビオチン化が、細胞増殖への反応性を増加させると報告されている。本研究でも、ビオチンが結合したタンパク質の機能が影響されたことにより、毒性が顕在化したのではないかと推測された。以上のことより、ビオチンの毒性が非常に強く、蓄積したビオチンがタンパク質と結合し、何らかの悪影響を与えた可能性が推測されたことから、早急にビオチンの上限量策定の検討を行う必要があると考えられた。

7. 乳児の食事摂取基準策定に必要な摂取量を求める目的で、LC-APCI/MS/MS法により母乳中脂溶性ビタミン濃度を測定した（図5）。授乳婦の血漿中脂溶性ビタミン濃度の測定および食事調査

を実施した。その結果、母乳中脂溶性ビタミン濃度と母乳中脂質濃度の間に強い正相関が認められたことから、脂溶性ビタミンの母乳への分泌には脂質が最も強く影響すると考えられた。

8. ビタミン-ビタミン相互作用の例として、ビタミンB<sub>2</sub>栄養状態の低下がビタミンB<sub>6</sub>栄養状態に及ぼす影響について検討を行った。

PNP (ピリドキシンリン酸) および PMP (ピリドキサミンリン酸) から PLP (ピリドキサールリン酸) への変換は、ビタミンB<sub>2</sub>の機能型である FMN (フラビンモノヌクレオチド) を補酵素とする PNP/PMP オキシダーゼによって触媒されるので、PLP の産生はビタミンB<sub>2</sub>の栄養状態によっても影響を受けると考えられる。また、PL (ピリドキサール) の排泄形態である 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) もアルデヒドオキシダーゼにより触媒されるので、ビタミンB<sub>2</sub>の影響を受けると考えられる。しかし、定量的な学問分野である栄養学的にはビタミンB<sub>2</sub>の摂取量がビタミンB<sub>6</sub>の栄養状態にどのように関わるのかについては不明である。そこで、ビタミンB<sub>2</sub>の摂取量がビタミンB<sub>6</sub>栄養に及ぼす影響についての知見を得ることを目的として行った。その結果、ビタミンB<sub>2</sub>摂取量の低下は、肝臓における PMP から PLP への変換にかかわる PMP/PNP オキシダーゼ活性を低下させ、肝臓 PLP の低下と肝臓 PMP の増加が起こることを指摘できた。

9. マウスにX線を全身照射して酸化ストレスを負荷した実験系において、体内葉酸濃度が酸化ビタミンであるビタミンCやEよりも著

しく低下することを示した。この結果は、酸化ストレスが負荷された条件では葉酸の必要量が増加する可能性を示した。また、種々の葉酸食 (低, 基本, 高) を投与したマウスにX線を照射して骨髄染色体損傷度を評価した実験、ならびに健康な男性に葉酸を負荷し、採取した末梢血にX線を照射してリンパ球染色体損傷度を評価した実験において、食事葉酸の有用性を検討し、葉酸が少ない状態でのみX線による染色体損傷が増強され、葉酸が染色体損傷の防御効果を有することを示した。また染色体損傷の防御という観点で、葉酸の必要量の上限があることを示した。

抗酸化能が低下していると考えられる高齢者などの食事摂取基準策定に際しては、酸化ストレスという視点で葉酸の必要量を考慮しなければならないことを明らかにした。

10. ガン予防を目的とした大規模なβ-カロテン介入試験におけるβ-カロテン摂取量と血漿β-カロテン濃度の関係を示した。ガン予防効果がみられた Linxian Study では血漿濃度は1~2 μM 程度であるが、喫煙者に肺ガン促進作用がみられた CARET や ATBC Study では2~8 μM に達した。したがって、過剰のβ-カロテン摂取は喫煙者において発ガンリスクを高める結果がみられたことから、血漿中濃度が高まると生体に害作用がもたらされる可能性がある。注目すべきは、これらの介入試験は全て合成カロテン

のサプリメント投与であり、野菜果実などの食物からの摂取を反映するかどうか不明確である。

害作用が現れる原因としてカロテノイドの酸化促進作用に由来することが示唆されている。一方、カロテノイドは抗酸化作用を発揮することも知られている。そこで、血漿に過剰に取り込まれたカロテノイドが酸化ストレスに対してどのように作用するかについて、リポタンパクの酸化安定性に対するβ-カロテンとルテインの影響を検討することから明らかにしようと試みた。まず、*in vitro* の試験では、ヒト血漿にβ-カロテン・あるいはルテインを過剰量添加し、その後超遠心でLDLとHDLを分離した。これらのリポタンパクのラジカル発生剤AAPHを用いた酸化安定性、および取り込まれたカロテノイド量を測定した。

その結果、β-カロテンはLDLにとりこまれやすく、β-カロテン添加によりLDLの酸化が促進した。一方、HDLでは変化はみられなかった。一方、ルテイン添加の場合、HDLにもLDLと同様にルテインはとりこまれた。添加による酸化促進傾向はいずれの場合もみられなかった。次に*ex vivo* 試験を行った。ヒトにβ-カロテンリッチなニンジンジュースあるいはβ-カロテンとルテインを等量含有するホウレン草ピューレを7日間摂食させ、摂食前後の血漿を得た。さらにAAPHを用いてそれぞれのリポタンパク質の酸化安定性を調べた。その結果、ニンジンジュース摂取で血漿β-カロテンが確実に上昇したことが認められた。一方、興味深いことにホウレン草ピューレではβ-カロテンは変化せず、ルテインのみが上昇した。ニンジンジュースの場合、LDLのβ-カロテン

も約2倍に上昇したが、酸化安定性には影響しなかった。HDLではβ-カロテンがやや上昇して酸化が抑えられる傾向がみられた。LDLでは*in vitro* でみられた酸化促進作用が*ex vivo* ではみられなかったが、これはおそらくβ-カロテンのLDLにおける局在性の相違によるのであろう。ホウレン草ピューレの場合、LDL、HDLともにルテイン含量が増加したが、酸化安定性には影響しなかった。ヒトHDLには抗動脈硬化作用があることが知られている。そのメカニズムとして、LCATによるコレステロールの逆転送とともに、PAF-AH (PAFアセチルヒドロラーゼ) やPON-1 (パラオキシナーゼ-1) による酸化LDLの分解消去作用が知られている。そこで、ニンジンジュースあるいはホウレン草ピューレ摂取前後のリポタンパクのPON-1活性を測定したところ、摂取後で明らかにPON-1活性が上昇することが明らかになった。

以上のことをまとめると、食事からカロテノイドを摂取した場合、今回のようなかなり極端な過剰摂取でも、介入試験でみられたサプリメント摂取のレベルの血漿濃度には到達しない。*in vitro* で添加する場合と実際に摂取してリポタンパクに取り込まれる場合では、カロテノイドのリポタンパクへの影響が異なる可能性がある。結論として、食事由来のカロテノイド摂取は大量の場合でも酸化促進に働く可能性は少ないことが明らかとなった。

## 11. 精度の高い簡便な食品中の B<sub>12</sub> の定量法の開発

現五訂日本食品標準成分表で採用されている *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (旧名 *L. leichimannii*) ATCC7830 を用いたバイオアッセイでは、B<sub>12</sub> の下方配位子の塩基がアデニンに置換したようなシュード B<sub>12</sub> や B<sub>12</sub> 以外のデオキシリボースやデオキシリボヌクレオチドなどにも作用し、B<sub>12</sub> の定量値に誤りを生じさせる。そこで、食品サンプル抽出液を TLC で分離後、B<sub>12</sub> 依存性大腸菌を用いたバイオオートグラム法で視覚化・定量化する方法を開発した。現在、従来方と本法との間の定量値の相関関係について実際に食品分析を行い検討している。

## 12. 藍藻由来栄養補助食品に含まれる B<sub>12</sub> の栄養評価

栄養補助食品として流通している藍藻由来食品に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 化合物を単離・同定することで、これら食品に含まれている B<sub>12</sub> 化合物の栄養評価を行った。その結果、すべての藍藻由来食品に含まれている主要な B<sub>12</sub> 化合物は、ヒトで生理的に不活性であるシュード B<sub>12</sub> であった。これらの栄養補助食品は、商品の栄養表示に B<sub>12</sub> を多量に含むことが記載されていても B<sub>12</sub> の供給源にならないことを明らかにした。

## 13. ビタミン B<sub>12</sub> の調理損失

日本人の B<sub>12</sub> 供給源である魚介類、卵類、乳類、食用藻類、畜肉類における調理損失についての知見は不十分である。そこで、これら食品類から代表的な食品を抽出し、基本的な加熱調理と

実際の調理の両方において B<sub>12</sub> の調理損失を検討した。

また、各種調理により、食品中の B<sub>12</sub> が吸収され易い遊離型 B<sub>12</sub> にどの程度転換されるかを検討した。

## 14. 食品タンパク質結合性 B<sub>12</sub> 吸収不全症の現状評価と対策法の確立について

ア) 日本人高齢者における萎縮性胃炎疾患と B<sub>12</sub> の栄養状態の把握について

日本人高齢者において萎縮性胃炎の疾病の程度（生化学的・臨床学的）と B<sub>12</sub> の栄養状態について検討している。

イ) B<sub>12</sub> 強化食品の検討

日本人の食文化を考慮した利用し易い B<sub>12</sub> 強化食品の調製法などを検討している。

ウ) 遊離型 B<sub>12</sub> を含む食品の評価方法の確立

五訂日本食品標準成分表では、吸収され易い遊離型 B<sub>12</sub> が含まれている割合の記載がない。そこで胃酸減少下でも遊離しやすい B<sub>12</sub> を含む食品を評価するために人工消化系を用いた評価系を構築している。

## 15. B<sub>12</sub> の食事摂取基準アップデートのための系統的レビュー

食事摂取基準（2005年版）で策定された B<sub>12</sub> の推奨量 2.4 μg/日（米国の推奨量と同じ値）は、適性値でなく、低すぎるとする意見が海外の文献に散見されるようになった。生体飽和量を基準にした研究結果から 6 μg/日程度が適切であると

報告されている。この値は、 $B_{12}$ の1日の吸収可能量や $B_{12}$ の出納などを考慮しても非常に妥当性が高いと考えられる。

#### 16. $\alpha$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロール併用による食物アレルギー発症抑制効果に関する研究

ビタミンEが卵白オボアルブミンをアレルゲンとする食物アレルギーの発症を抑制し、その機序が $\alpha$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールでは異なることを見出した。そこで、今年度は両者併用により相加・相乗的に食物アレルギー発症が抑制される可能性について検討した。前年度はkg当り500mgの $\alpha$ -あるいは $\gamma$ -トコフェロールを含む食餌を実験食として用いたことから、今回の実験では、各々250mgを含む高ビタミンE食を調整し、実験に供した。その結果、今回の食餌組成では食物アレルギー発症に対して前年度にみられたほど顕著な抑制効果はみられず、両者併用による相加・相乗効果もみられなかった。ビタミンE、特に $\alpha$ -トコフェロール摂取によって食物アレルギー発症の抑制を図るためにはある程度高いビタミンE摂取（基準食の10倍程度）が必要であることが示唆された。

#### 17. ビタミンEのアンチエイジング作用とそのメカニズム—老化モデル動物を用いての検討—

山口県周防大島における健常高齢者を対象とした疫学研究から、高齢者におけるビタミンE栄養状態と細胞性免疫能とが密接に関連しており、高齢者の健康保持・増進を図る上でも重要であることが示唆されている。本年度は、

ヒトの本態性高血圧症のみならず老化モデルとしても利用されているSHRラットを用いて、ビタミンEの免疫能を指標としたアンチエイジング作用とそのメカニズムについて検討した。その結果、前年度の周防大島在住の高齢者においてみられた結果と同様に、SHRラットにおいても血漿VLDLコレステロール当りの $\alpha$ -トコフェロール濃度が高いほど血漿一酸化窒素(NO)濃度が低い傾向を認めた( $r=0.511$ )。また、12週齢に比べ20週齢の脾臓リンパ球は幼若化能の低いことを認め、加齢に伴いTリンパ球機能の低下することを再確認した。さらに、NOの合成阻害剤であるL-NMMA添加により、脾臓リンパ球の幼若化能が改善される傾向を認めたことから、SHRの加齢に伴う細胞性免疫能低下にNO濃度の上昇が関与しており、その上昇を抑制することによりビタミンEが低下した免疫能を改善している可能性が示唆された。

#### 18. 高齢者のビタミンD必要量

従来、食事調査と血液中ビタミン濃度測定を同時に行った報告は、わが国では乏しい。また、ほとんど外出しない高齢者集団を調査対象としたので、日照によるビタミンD産生はおそらく無視できる。その結果、平均して、1日7 $\mu$ g程度摂取しているにも関わらず、血液中2,5-ヒドロキシビタミンD濃度は、10ng/ml程度と非常に低かった。本研究から示唆されることは、高齢者においてはおそら

く、ビタミンDは現行の5 µg/日より、はるかに多い量が必要とされるということである。

#### 【普及活動】

① 平成18年度：4回開催（1.10月7日岐阜大学，②12月16日兵庫県姫路市キャスパール，③12月17日滋賀県立大学，④1月30日滋賀県大津市びわ湖ホール）。

#### C. 倫理面への配慮

本研究は、各研究施設の倫理委員会規定に従って実施する。験者は、被験者に対して、あらかじめ実験の主旨、方法、実験に参加することの不利益、苦痛を説明し、被験者の自由意志でいつでも実験から離脱できることを文書で保証した後、文書による被験者の実験参加同意を得て研究を実施する。取得されたデータは、基本的には全被験者の傾向を求めるような処理にかける。また、個人名は研究者が管理し、データの管理は記号により行う。

#### D. 主な発表論文

1. Shibata K, Fukuwatari T, Iguchi Y, Kurata Y, Sudo M, and Sasaki R. Comparison of the effects of di(2-ethylhexyl)phthalate, a peroxisome proliferator, on the vitamin metabolism involved in the energy formation in rats fed with a casein or gluten diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2006) 70(6), 1331-1337.

2. Murakami, K., Sasaki, S., Takahashi, Y., Okubo, H., Hosoi, Y., Horiguchi, H., Oguma, E., and Kayama, F. Dietary glycemic index and load in relation to metabolic risk factors in Japanese female farmers with traditional dietary habits. *Am.*

*J. Clin. Nutr.*, 83, 1161-1169 (2006).

3. Tsugawa, N., Shiraki, M., Suhara, Y., Kamao, M., Tanaka, K., and Okano, T., Vitamin K Status of Healthy Japanese Women; Age-related Vitamin K Requirement for  $\gamma$ -Carboxylation of Osteocalcin. *Am. J. Clin. Nutr.*, (2006) in press.

4. Okamoto N, Murata T, Tamai H, Tanaka H, Nagai H. Effects of alpha tocopherol and probucol supplements on allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.*, 141, 172-180 (2006).

5. 森口 覚. 加齢と免疫力, (2006) 横越英彦編, 幸書房, 2006, pp.19-36.

6. 中嶋いつ子, 関戸啓子, 寺尾純二. HDLの酸化安定性と抗酸化機能に及ぼす $\beta$ -カロテンおよびルテインの影響. 日本栄養食糧学会中四国支部大会. 2006年10月29日, 徳島.

7. Endoh K, Murakami M, Araki R, Maruyama C, and Umegaki K. Low folate status increases chromosomal damage by X-ray irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, (2006), 82, 223-30.

8. Isa Y, Tsuge H. and Hayakawa T. Effect of vitamin B-6 deficiency on S-adenosylhomocysteine hydrolase activity as a target point for methionine metabolic regulation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, (2006) 52(5), 302-306.

9. 渡邊敏明ほか. 健康成人における葉

酸の必要量についての検討. 日本栄養・食糧学会誌, (2006) 59, 169-176.

10. Miyamoto E, Tanioka Y, Nakao T, Barla F, Inui H, Fujita T, Watanabe F, Nakano Y.

Purification and characterization of a corrinoid-compound in an edible cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* as a Nutritional Supplementary Food”, J. Agric. Food Chem., in press (Published on Web 11/18/2006).

E. 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ー	京都大学・院 昭和 54 年 農学博士 食品工学	滋賀県立大学 人間文化学	教授
佐々木敏	副統括. 文献レビュー	ルーベン大学・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 策定企画・運営 担当リーダー
岡野登志夫	脂溶性ビタミンリーダー	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 <sub>6</sub> 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 <sub>12</sub> の必要量	大阪府立大学・院 昭和62年 農学博士 農芸化学	鳥取大学 食品化学	教授

## II. 主任研究者の報告書

## II. 主任研究者の報告書

### 1. 高脂肪食がパントテン酸の必要量におよぼす影響

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

B 群ビタミンの一つであるパントテン酸は主に脂質代謝に関与するため、脂肪摂取量とパントテン酸の必要量は関係があると考えられている。しかしながら、これらの関係を示す具体的な情報は乏しい。そこで、脂肪摂取量とパントテン酸の必要量の関係を調べるため、このシリーズの第 1 報として、脂肪摂取量の増加は尿中へのパントテン酸排泄量の低下をもたらすことを明らかにした。この現象は、脂肪摂取量の増加がパントテン酸の必要量の増加を示唆するデータであった。そこで、このことを強固にするため、本研究を行った。実験動物には 3 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。実験 1 では、飼料中のパントテン酸量を 0%、0.00037%、0.00074%、0.00147%（対照群）とし、4 週間飼育し、体重増加量などを指標として 5%脂肪食（通常食）におけるパントテン酸の必要量を求めた。その結果、5%脂肪食（通常食）におけるパントテン酸の必要量は 0.00037%にかなり近いことが分かった。そこで、実験 2 ではパントテン酸量を 0.00037%とし、5%脂肪食、30%脂肪食を与え、4 週間飼育した。最終日の血液、肝臓、副腎、尿中のパントテン酸量を測定し、高脂肪食がパントテン酸の必要量に影響をおよぼすか検討した。その結果、30%脂肪食群の体重増加量、血液、肝臓、副腎中のパントテン酸量が低値を示した。これは、30%脂肪食でパントテン酸の栄養状態が悪化したことを示している。これらより、高脂肪食がパントテン酸の必要量を高めることが明らかとなった。

## 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、脂肪摂取量の増加に伴うパントテン酸の必要量の増大は明らかになっていない<sup>1)</sup>。この現象は、脂肪摂取量の増加がパントテン酸の必要量の増加を示唆するデータであった。本研究では、さらにこのことを強固するため、高脂肪食がパントテン酸の必要量におよぼす影響を調べることを目的とした。実験 1 では、通常食である 5%脂肪食投与におけるパントテン酸の必要量を求め、実験 2 では、そのパントテン酸必要量下における高脂肪食投与により、パントテン酸の栄養状態が悪化するか否かを検討した。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. 実験方法

### 1. 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、明暗サイクルは、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 系雄ラットを日本クレア株式会社（東京）より購入し、平均体重がほぼ均等になるように実験 1 では 4 匹ずつ 4 群に、実験 2 では 5 匹ずつ 2 群に分け、ラット用代謝ケージ (CT-10, 日本クレア株式会社, 東京) に一匹ずつ入れて飼育した。

実験 1 では表 1 に、実験 2 では表 2 に示した飼料を与え、4 週間飼育した。実験 1 では、20%カゼイン 5%脂肪食投与群を対照群とし、試験群ではパントテン酸量を 0 (0%), 1/4 量 (0.00037%), 1/2 量 (0.00074%) とした。実験 2 では、パントテン酸を 0.00037% を含む 5%脂肪食を対照群とし、試験群には脂肪含量を 30% とした飼料を与えた。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 27 の午前 9 時～Day 28 の午前 9 時 : 24 時間) を集めた。尿は塩酸酸性下で集め -20°C で保存した。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 28 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。実験 1 では、臓器重量と肝臓および副腎中パントテン酸量、尿中の水溶性ビタミン量を、実験 2 では、血清中のトリグリセライド量、総コレステロール量、遊離脂肪酸量、さらに、血液、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。