

II. 主任研究者の報告書

3. 尿中ビタミン B₁₂ 排泄量におよぼす要因

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

我々は、ビタミン B₁₂ の主な排泄経路は尿でないため、今までビタミン B₁₂ 尿中排泄量に関しては、あまり研究をしてこなかった。しかし、ビタミン B₁₂ 尿中排泄量分布には大きな個人差が見られたので、その排泄量がどのような要因によって支配されているかを調べた。実験①-1 として、シアノコバラミン付加実験を行った。推奨量の 625 倍量のシアノコバラミン 1.5 mg/日を付加させ、24 時間尿を採取した。実験①-2 として、食品からのビタミン B₁₂ 付加実験を行った。推奨量の 28 倍量の 66.7 µg/日のビタミン B₁₂ を含む食事を 1 日間摂取させ、24 時間尿を採取した。実験②として、その他の要因との関係を解析した。普通食を摂取し、24 時間尿を採取し、身長、体重、体表面積、クレアチニン、尿量との関係について解析した。その結果、尿中へのビタミン B₁₂ 排泄量は摂取量には全く応答しなかった。身長、体重、体表面積、クレアチニン、尿量について解析したところ、尿量との間にも非常に強い正の相関が認められた。すなわち、尿中へのビタミン B₁₂ 排泄量の個人差は、尿量の多寡に起因することが明らかになった。

A. 目的

ビタミン B₁₂ は、通常シアノコバラミンをさすが、これは生体から効率よく抽出するときに生成する人工産物である。食物中には、アデノシルコバラミンやヒドロキニコバラミンとして存在している。また、ビタミン B₁₂ は他の水溶性ビタミンと異なり、吸収機構に特徴がある¹⁾。

ビタミン B₁₂ の吸収には、B₁₂ 結合タンパク質である内因子(IF)や R-バインダー(ハプトコリン)、トランスコバラミン(TC)が必要である。経口投与されたビタミン B₁₂ は、遊離すると唾液腺由来の糖タンパク質である R-バインダーに結合する。ここで R-バインダーは、強い親和性を持つため、ビタミン B₁₂ が微生物に摂取されないように、ビタミン B₁₂ をトラップしている。そして十二指腸までくると、R-バインダーが膵液中のトリプシンなどの消化酵素によって消化される。その後、胃の壁細胞から分泌される糖タンパク質である内因子に移行する。内因子と結合したビタミン B₁₂ は、腸管を下降していき、ほぼ中性の pH でカルシウム存在下において、回腸下部の刷子縁膜微絨毛に分布するレセプターにより、ビタミン B₁₂ が取り込まれる。その後、トランスコバラミンと結合し、門脈へと運ばれる。

つまり、ビタミン B₁₂ の吸収には内因子が不可欠であり、ビタミン B₁₂ の吸収は、他の水溶性ビタミンのように摂取量ではなく、内因子の量によって決まるとされている。内因子の飽和量は、1回の食事あたり 1.5~2.0 μg¹⁾、1日3回食事をとるとすると、1日 4.5~6.0 μg である。

また、ビタミン B₁₂ の主な排泄経路は肝臓から胆汁を経て、糞中に排泄する経路である²⁾。ビタミン B₁₂ の1日当たりの排泄量は、ビタミン B₁₂ 体内貯蔵量(約 2~3 mg)の 0.1~0.2% である¹⁾。体内貯蔵量が 3 mg だとすると、1日の排泄量は 3~6 μg である。このうち、ビタミン B₁₂ は尿中に 80~270 ng 排泄されるので、尿中ビタミン B₁₂ 排泄量は全ビタミン B₁₂ 排泄量の約 2~5% であり、尿中に排泄される量はわずかである。

このようにビタミン B₁₂ は、吸収機構が特異的であり、摂取量が尿中排泄量と関係がないと考えられていることや、ビタミン B₁₂ の主な排泄経路が尿ではないことから、我々はビタミン B₁₂ についてあまり研究をしてこなかった。しかし、事前に測定したデータをもとに尿中ビタミン B₁₂ 排泄量の分布を描くと、10~160 pmol/day と幅広く分布していることが分かった(図 1)。そこでその要因が何かを調べることにした。

B. 実験方法

1. 摂取量に関する実験①-1

1-1. 被験者

男 10 名、女 10 名、計 20 名で行った。1 週間前から、ビタミン剤等は摂取しないように指導した。本研究は滋賀県立大学倫理審査委員会において承認を受けたものである。

1-2. 実験計画

実験計画の概略を図 2 に示した。1 日目 (Day 1) では、自由食を摂取させ、2 回目の尿から翌日の 1 回目の尿までを蓄尿し、これを Day 1 の 1 日尿とした。

2 日目 (Day 2) では、自由食を摂取させた。更に推奨量 2.4 μg の 625 倍であるシアノコバラミン 1.5 mg を 1 回目の尿排泄後に摂取させた。2 回目の尿から翌日の 1 回目の尿までを蓄尿し、これを Day 2 の 1 日尿とした。

1-3. 分析

1 日尿を採取した後、この尿を使用するまで -20°C で保存した。

測定項目は、尿中ビタミン B_{12} 排泄量である。

ビタミン B_{12}

尿は前処理を行い、測定用試料とした。尿中のビタミン B_{12} はの報告による、ビタミン B_{12} 要求株である乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830 (American Type Culture Collection, USA) を用いた微生物学的定量法を基に改変した、以下に記す方法で測定した³⁾。以下にその方法を示す。

(1) 保存用寒天培地・継代用斜面寒天培地の作成方法

- ① 表 2 に示したライヒマニ保存用基礎培地 (日水製薬株式会社, 東京) 4.97 g 秤量し、ビーカーに入れ、水 100 ml を加えて沸騰水浴中で加熱溶解させた (通常 20 分程度)。
- ② 直ちに溶解させた培地を 50°C くらいまで自然放置した。
- ③ ② で作成した培地 (冷えすぎると固まる) をネジ口試験管 (16.5 mm \times 105 mm, 丸底, 株式会社マルエム, 大阪) に 4 ml ずつ分注した。
- ④ オートクレーブ (121°C , 5 min) を用いて滅菌した後、平面保存用寒天培地作成の

場合はそのまま立てて室温に放置して固め、継代用斜面寒天培地作成の場合は斜めにして室温に放置して固めた。作成した両寒天培地は冷蔵庫中で保存した。

(2) 継代用液体培地の作成方法

- ① 表 3 に示したライヒマニ接種用培地 (日水製薬株式会社, 東京) 3.47 g を秤量し、ビーカーに入れ、水 100 ml を加えて沸騰水浴中で加熱溶解させた (通常 10 分程度)。
- ② 直ちに溶解させた培地を氷水中にて 20°C に冷却した。
- ③ ② で作成した培地を試験管 (12 \times 120 mm, 旭テクノガラス株式会社, 東京) に 5 ml ずつ分注し、アルミキャップをした。
- ④ オートクレーブ (121°C , 5 min) を用いて滅菌した後、氷冷した。作成した液体培地は冷蔵庫中で保存した。

(3) ビタミン B_{12} 定量用培地の作成方法 (当日調製)

- ① 表 4 に示したビタミン B_{12} 定量用基礎培地 (日水製薬株式会社, 東京) 8.3 g 秤量し、ビーカーに入れ、水 80 ml を加えて沸騰水浴中で加熱溶解させた (通常 20 分程度)。
- ② 直ちに溶解させた培地を氷水中にて 20°C まで冷却した。
- ③ 添付のポリソルベート 80 溶液 2.0 ml を加え、水で全容を 100 ml にした。

(4) 使用菌株の継代方法と保存方法

- ① 使用菌株が植えてある保存用寒天培地から菌体を一白金耳とり、継代用斜面寒天培地に塗布した。菌を繁殖させるため

に 37°C で 18～24 時間培養した。

- ② 活力の高い菌を得るために、培養した斜面寒天培地から菌体を一白金耳とり、新しい斜面寒天培地に塗布した。菌を繁殖させるために 37°C で 18～24 時間培養した。
- ③ 継代用液体培地に、斜面寒天培地から菌体を一白金耳とり、菌を繁殖させるために 37°C で 18～24 時間培養した。
- ④ 菌を保存する場合は、液体培地で培養した菌体を一白金耳として平面保存用寒天培地に尖刺し、37°C で 18～24 時間培養した。培養後は冷蔵し、1 か月に 1 回植え継ぎした。

(5) 接種用菌の作成方法

- ① (4)-③の操作で得た液体培地に培養してある菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後、遠心分離 (1000 × g, 20°C, 5 min) し、沈殿部分の菌体を得た。
- ② 菌体を 0.9 %滅菌 NaCl 5 ml に懸濁し、遠心分離 (1000 × g, 20°C, 5 min) 後、再び 0.9 %滅菌 NaCl 5 ml で洗浄した。この洗浄操作を計 5 回行った。
- ③ 最終的に集めた菌体を接種用菌体液とした。

(6) 定量操作方法

- ① 表 5 に従って溶液を定量用試験管 (12 × 75 mm, アズワン株式会社, 大阪) に分注した。検量線用のビタミン B₁₂ 標準溶液にはシアノコバラミン (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。検量線用, サンプル用共に 3 連で行った。
- ② 分注した試験管にキャップをし、オートクレーブ (110°C, 3 min) を用いて滅菌

し、終了後直ちに氷冷した。その後、(5)-③の試験管に、調製した接種用菌体液を 20 μl ずつ分注した。No. 0 の 1 本には菌を接種しなかった (雑菌の繁殖がないことを確認するため)。

- ③ 37°C で 20 時間培養した。
- ④ 分光光度計を 660 nm の波長にし、No.0 の欠菌の試験管で吸光度の 0 合わせを行った。
- ⑤ 全ての試験管の吸光度を測定した。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、未知試料中のビタミン B₁₂ 濃度を算出した。検量線は、通常、図 12 のようになる。

(7) 計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのビタミン B₁₂ 量 (pg / tube) を求めた。これを x とし、尿中のビタミン B₁₂ 量 (ng / day) を、{x (pg / tube) / 分注した試料量 (0.5 ml / tube)} × (希釈倍率) × {1.8 (ml)^{*1} / 0.9 (ml)^{*2}} × 尿量 (ml) / 1000^{*3} より求めた。

*¹: 尿中ビタミン B₁₂ をすべて遊離型にした後の量

*²: ビタミン B₁₂ をすべて遊離型にした時に用いた尿量

*³: 単位を pg から ng にするため

(8) サンプルの使用方法

尿の前処理について、以下に示した。

- ① 尿 0.9 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.8) 0.18 ml, 水 0.68 ml, 0.025% KCN 0.02 ml をサンプルストックチューブ (2 ml, ビーエム機器株式会社, 東京) に分注した。
- ② キャップをし、オートクレーブ (120°C, 5 min) を用いて滅菌し、終了後直ちに氷冷した。

- ③ 10%メタリン酸溶液 0.02 ml を加え、遠心分離 (9100×g , 3 min) し、その上清を測定の試料とした。通常、ヒト尿の場合は 500 μl で、ラット尿の場合は 100 μl 使用すれば、検量線内に入る。

1-4. 統計学的解析

数値はすべて平均値 ± 標準誤差 (SEM) で表した。GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。

2. 摂取量に関する実験①-2

2-1. 被験者

男 2 名、女 2 名、計 4 名で行った。1 週間前から、ビタミン剤等は摂取しないように指導した。本研究は滋賀県立大学倫理審査委員会において承認を受けたものである。

2-2. 実験計画

実験計画の概略を図 3 に示した。1 日目 (Day 1) では、自由食を摂取させ、2 回目の尿から翌日の 1 回目の尿までを蓄尿し、これを Day 1 の 1 日尿とした。

2 日目 (Day 2) では、表 1 に示した規定食を摂取させた。規定食には、ビタミン B₁₂ 含量の多いアサリを使用し、推奨量 2.4 μg の 28 倍であるビタミン B₁₂ 66.7 μg を摂取させた。2 回目の尿から翌日の 1 回目の尿までを蓄尿し、これを Day 2 の 1 日尿とした。

2-3. 分析

1 日尿を採取した後、この尿を使用するまで -20°C で保存した。測定項目は、尿中ビタミン B₁₂ 排泄量である。実験①-1 と同様に行った。

2-4. 統計学的解析

実験①-1 と同様に行った。

3. その他の要因に関する実験②

3-1. 被験者

A 県の 20 歳前後の女子学生 99 名で行った。本研究は滋賀県立大学倫理審査委員会において承認を受けたものである。

3-2. 実験計画

実験計画の概略を図 4 に示した。自由食を摂取させ、2 回目の尿から翌日の 1 回目の尿までを蓄尿し、これを 1 日尿とした。

3-3. 分析

1 日尿を採取した後、この尿を使用するまで -20°C で保存した。

測定項目は、尿中ビタミン B₁₂ 量、身長、体重、体表面積、尿中クレアチニン、尿量である。

ビタミン B₁₂

実験①-1 と同様に行った。

クレアチニン

尿はそのまま測定試料とした。尿中のクレアチニンは、以下に記す方法で測定した。以下にその方法を示す。

(1) 定量操作方法

① 表 6 に従って溶液を 1.5 ml チューブに分注し、攪拌後、37°C で加温した。検量線のクレアチニン標準溶液には作成にはクレアチニン (和光純薬工業株式会社、大阪) を用いた。

② 正確に 20 分後、分光光度計を 500 nm の波長にし、No. 0 のチューブで吸光度の 0 合わせを行った。

③ 全ての吸光度を測定した。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、未知試料中の

クレアチニン濃度を算出した。検量線は、通常、図 13 のようになる。

(2) 計算方法

まず検量線より試験溶液あたりのクレアチニン量 ($\mu\text{g}/\text{tube}$) を求めた。これを x とし、尿中のクレアチニン量 (g/day) を、 $\{x (\mu\text{g}/\text{tube})/\text{分注した試料量} (0.004 \text{ ml}/\text{tube})\} \times \text{尿量} (\text{ml})/1000000^{*1}$ より求めた。

*1: 単位を μg から g にするため

(3) サンプルの使用方法

尿は直接測定試料とした。通常、ヒト尿の場合は $4 \mu\text{l}$ 使用すれば、検量線内に入る。

3-4. 統計学的解析

GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用い、身長、体重、体表面積、クレアチニン、尿量と尿中ビタミン B_{12} 排泄量との関係について分析した。

C. 結果

1. 摂取量に関する実験①-1

化学的合成品であるシアノコバラミンを大量に摂取させた時に、尿中へのビタミン B_{12} 排泄量が増大するか否かを調べた。図 5 に示したように、摂取前、摂取後において尿中ビタミン B_{12} 排泄量は 1.3 倍に増加した。しかし、他のビタミンと比較してみると、例えばビタミン B_1 の場合、ある実験において、推奨量 (1.1 mg) の 6.5 倍のビタミン B_1 を摂取し、摂取前、摂取後に尿中ビタミン B_1 排泄量を測定した。すると、尿中ビタミン B_1 が約 15 倍に増加した。このことから、今回の結果を見直すと、推奨量の 625 倍のビタミン B_{12} を摂取したにも関わらず、1.3 倍しか増加していなかった。

2. 摂取量に関する実験①-2

次に、食事性のビタミン B_{12} 摂取量を増大させた時に、尿中へのビタミン B_{12} 排泄量が増大するか否かを調べた。図 6 に示したように、摂取前、摂取後において尿中ビタミン B_{12} 排泄量に変化はなかった。食品から多量にビタミン B_{12} を摂取しても、尿中ビタミン B_{12} 排泄量は変化しなかった。食品はゆっくり遊離し、吸収されるまでに時間がかかるが、この実験結果から、食品からの摂取量は尿中ビタミン B_{12} 排泄量が増加する主要な要因ではないことが明らかになった。

3. 他の要因に関する実験

図 7~12 に示した。尿中へのビタミン B_{12} 排泄量を、身長、体重、体表面積、クレアチニン、あるいは尿量との間に相関があるか否かを調べた。クレアチニン及び、尿量との間に有意差が認められた。特に、尿量と尿中ビタミン B_{12} 排泄量の関係は、非常に強い正の相関が認められた。

D. 考察

実験①-1 より、遊離型であるシアノコバラミンを多量に摂取させたが、尿中ビタミン B_{12} 排泄量には変化が認められなかった。また、実験①-2 より、結合型である食品からビタミン B_{12} を多量に摂取させたが、尿中ビタミン B_{12} 排泄量に変化は認められなかった。以上のことから、ビタミン B_{12} 摂取量は、尿中ビタミン B_{12} 排泄量が増加する主要な要因ではないことが明らかになった。ビタミン B_{12} の吸収機構は特異的で、ビタミン B_{12} が吸収されるには、内因子が

不可欠であることから、やはり摂取量とは関係ないことが明らかになった。

実験②より、尿中ビタミン B₁₂ 排泄量と尿量との間に相関が認められた。有意差 $p < 0.0001$ と非常に強い相関であった。

このことから、尿中ビタミン B₁₂ 排泄量におよぼす要因は、尿量であることが明らかになった。尿 1 L 中にはビタミン B₁₂ が 41 ± 21 pmol 含まれていることが明らかになった。この指標は、摂取量には関係がないことから、栄養指標には適さないが、何らかの疾病の指標になるのではないかと考えられる。

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 (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. 渡辺文雄, 宮本恵美, 日本人の水溶性ビ

タミン必要量に関する基礎研究 平成 15 年度 総括・分担研究報告書, pp.366-373, 2004.

2. 山田正二, ビタミンの事典 (日本ビタミン学会編), 朝倉書店, pp.342-345, 1996.

3. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamazi R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, and Nakano Y, Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J.Agric. Food Chem.*, **46**, 5177-5180(1998)

表 1. 摂取量に関する実験①-2 Day2 規定食と栄養素摂取量 (男性)

朝食	食パン (70g), ジャム, ゆで卵, ミニトマト, チーズ, 野菜ジュース
昼食	ごはん (260g), みそ汁, アサリのバター炒め, 卵焼き, 豆腐, 野菜サラダ, ゼリー
夕食	ごはん (260g), アサリのバター炒め, 味噌カツ, マカロニサラダ, 青菜のお浸し

栄養素摂取量	朝食	昼食	夕食	総計
エネルギー (kcal)	390	783	1064	2237
たんぱく質 (g)	19.1	33.8	38.7	91.6
脂質 (g)	15.0	15.3	40.6	70.9
炭水化物 (g)	43.3	120.6	127.9	291.8
ビタミン B ₁₂	1.3	33.1	32.3	66.7

表 2. ライヒマニ保存用培地 (保存用培地 100 ml 中)

酵母エキス	0.85 g	トマトジュース粉末	0.37 mg
ペプトン	0.85 g	ポリソルベート 80	0.10 mg
ブドウ糖	1.10 g	カンテン	1.50 mg
リン酸二水素カリウム	0.20 g		

表 3. ライヒマニ接種用培地 (接種用培地 100 ml 中)

酵母エキス	0.85 g	トマトジュース粉末	0.37 mg
ペプトン	0.85 g	ポリソルベート 80	0.10 mg
ブドウ糖	1.10 g	リン酸二水素カリウム	0.20 mg

表 4. ビタミン B₁₂ 定量用基礎培地 (基礎培地 2 倍濃度 1 ml 中)

カザミノ酸	15 mg	塩酸ピリドキシリン	4 µg
L-シスチン	400 µg	塩酸ピリドキサール	4 µg
DL-トリプトファン	400 µg	塩酸ピリドキサミン	800 ng
硫酸アデニン	20 µg	葉酸	200 ng
塩酸グアニン	20 µg	リン酸二水素カリウム	1 µg
ウラシル	20 µg	リン酸一水素カリウム	1 mg
キサンチン	20 µg	硫酸マグネシウム	400 µg
塩酸チアミン	1 µg	硫酸第一鉄	20 µg
リボフラビン	1 µg	硫酸マンガン	20 µg
ビオチン	10 ng	L-アスパラギン	200 µg
ニコチン酸	2 µg	ブドウ糖	40 mg
パラアミノ安息香酸	2 µg	酢酸ナトリウム (無水)	20 mg
パントテン酸カルシウム	1 µg	アスコルビン酸	4 mg

表 5. ビタミン B₁₂ 定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	0.1ng / ml ビタミン B ₁₂ (μ l)	1.0ng / ml ビタミン B ₁₂ (μ l)	H ₂ O (μ l)	0.1 M リン酸 カリウム 緩衝液 (μ l)	ビタミン B ₁₂ 定量用 2 倍濃度基礎培地 (ml)	Total (ml)
0	0	-	800	200	1	2
1	100	-	700	200	1	2
2	150	-	650	200	1	2
3	200	-	600	200	1	2
4	250	-	550	200	1	2
5	300	-	500	200	1	2
6	350	-	450	200	1	2
7	400	-	400	200	1	2
8	500	-	300	200	1	2
9	-	80	720	200	1	2
10	-	100	700	200	1	2
11	-	120	680	200	1	2
12	-	150	650	200	1	2
13	-	170	630	200	1	2
14	-	200	600	200	1	2
15	-	250	550	200	1	2
16	-	300	500	200	1	2
17	-	350	450	200	1	2
18	-	400	400	200	1	2
19	-	450	350	200	1	2
20	-	500	300	200	1	2
試料	a		800-a	200	1	2

表 6. クレアチニン定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	1mg / L クレアチニン 標準溶液 (μ l)	H ₂ O (μ l)	アルカリ飽和 ピクリン酸 (μ l)	Total (ml)
0	0	800	560	1.36
1	2	798	560	1.36
2	4	796	560	1.36
3	6	794	560	1.36
4	8	792	560	1.36
5	10	790	560	1.36
6	12	788	560	1.36
試料	a	800-a	560	1.36

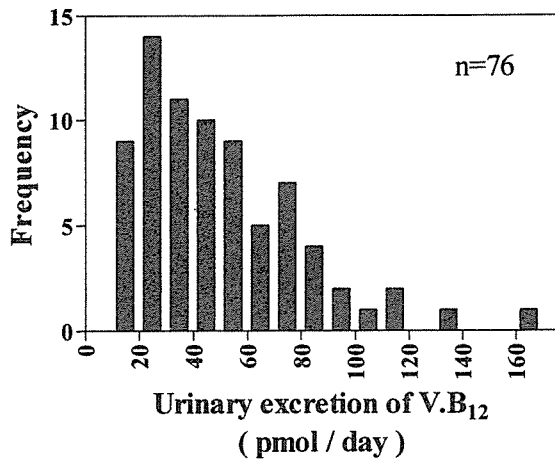


図1. 尿中ビタミンB₁₂排泄量の分布

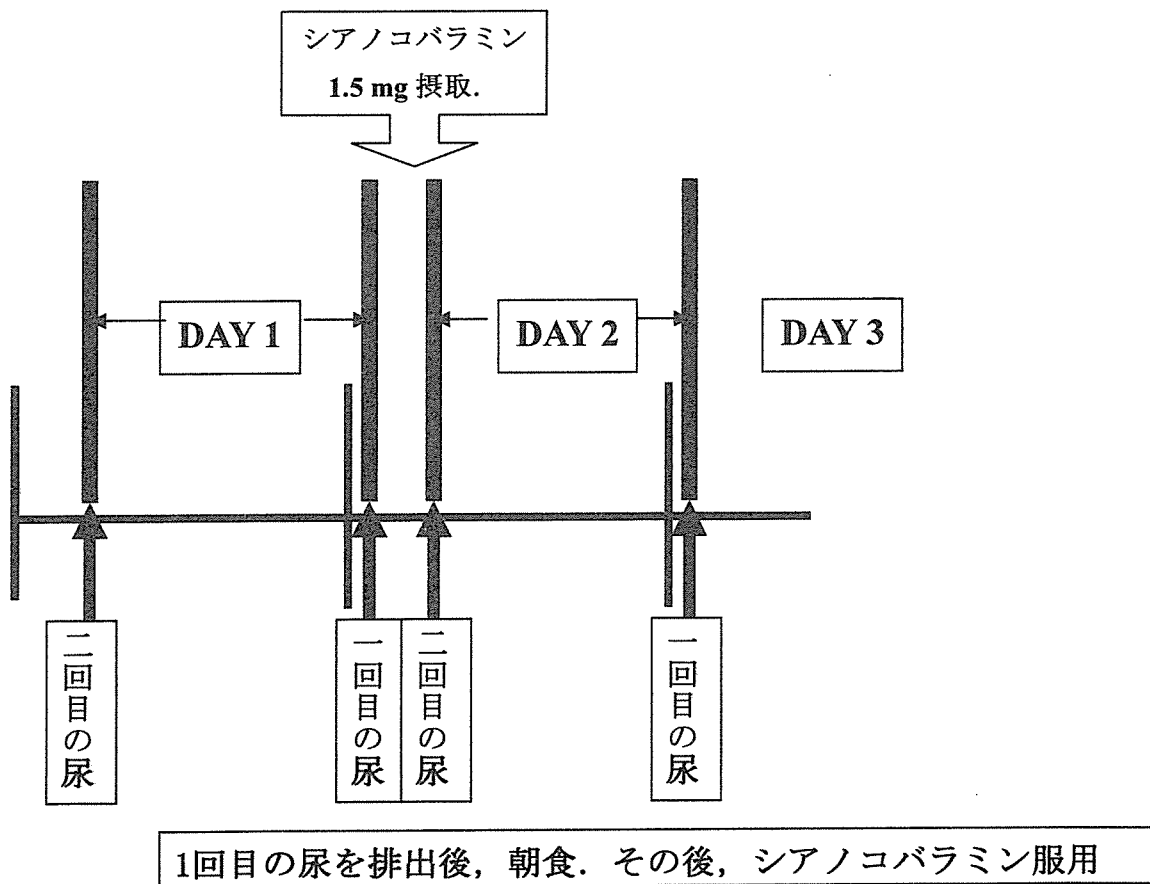


図2. 摂取量に関する実験①-1 実験計画の概略

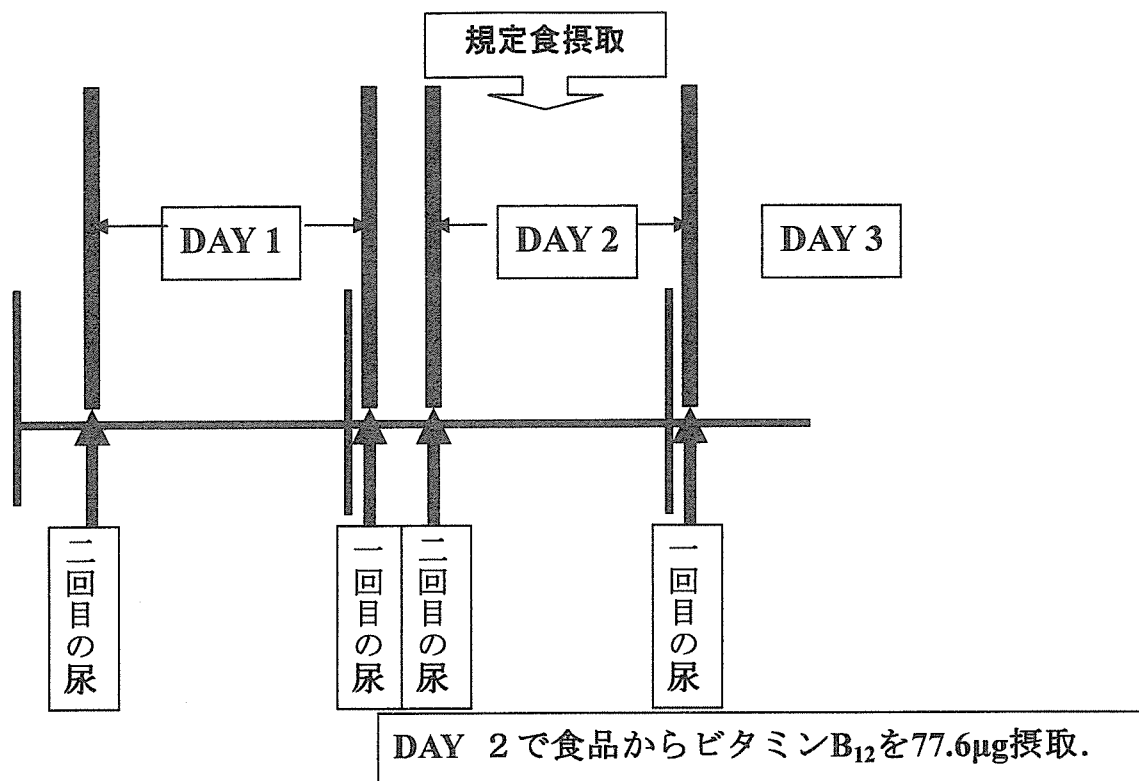


図3. 摂取量に関する実験①-2 実験計画の概略

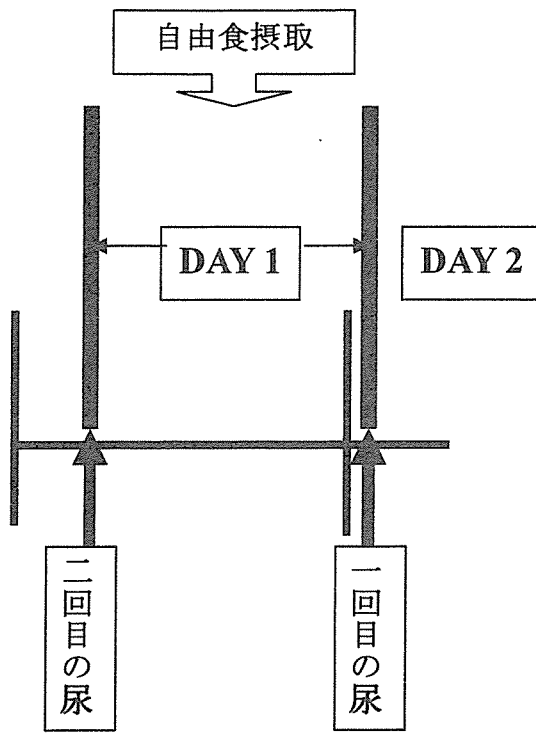


図4. 尿中ビタミンB₁₂排泄量を支配する要因に関する実験②の計画の概略

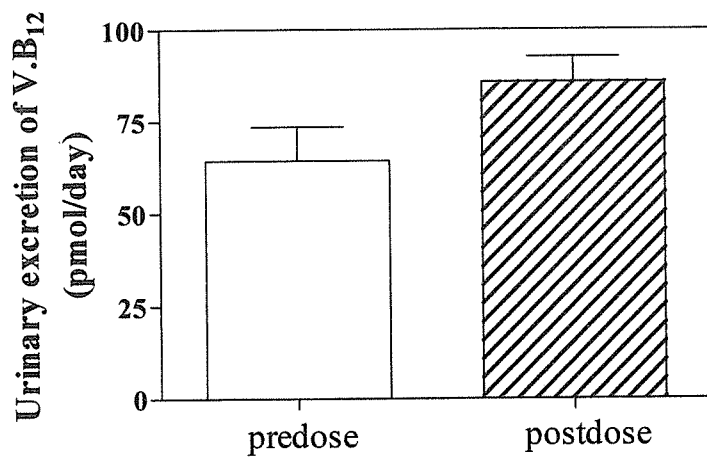


図 5. 摂取量に関する実験①-1

predose : 自由食 postdose : シアノコバラミンを 1.5 mg/日 投与

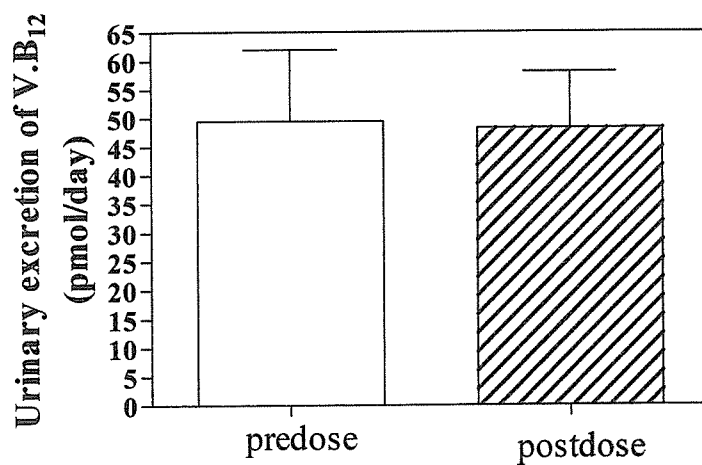


図 6. 摂取量に関する実験①-2

predose : 自由食 postdose : 66.7 μ g/日 のビタミン B₁₂ を含む食品を投与

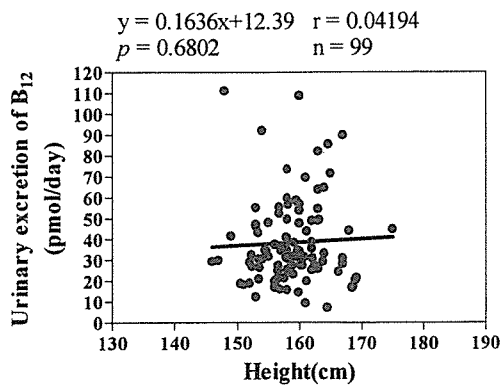


図 7. 身長と尿中ビタミン B₁₂ 排泄量との関係

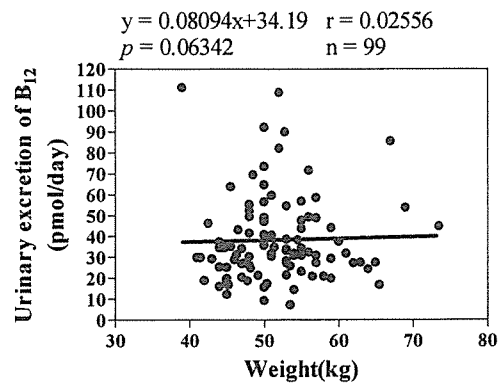


図 8. 体重と尿中ビタミン B₁₂ 排泄量との関係

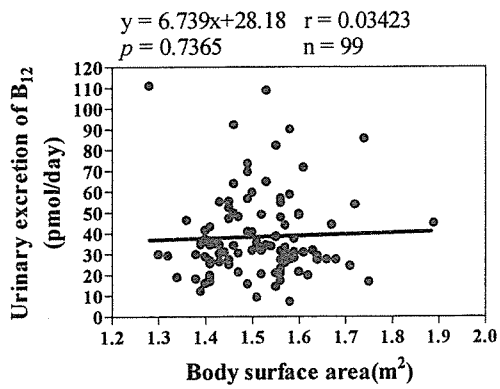


図 9. 体表面積と尿中ビタミン B₁₂ 排泄量との関係

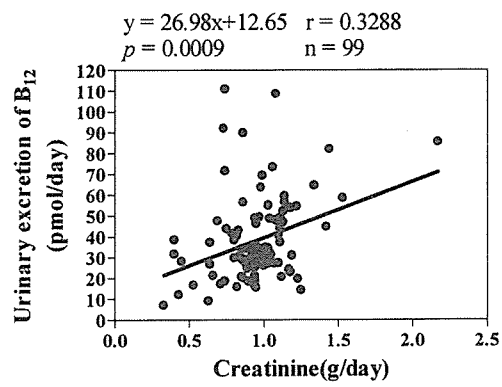


図 10. クレアチニンと尿中ビタミン B₁₂ 排泄量との関係

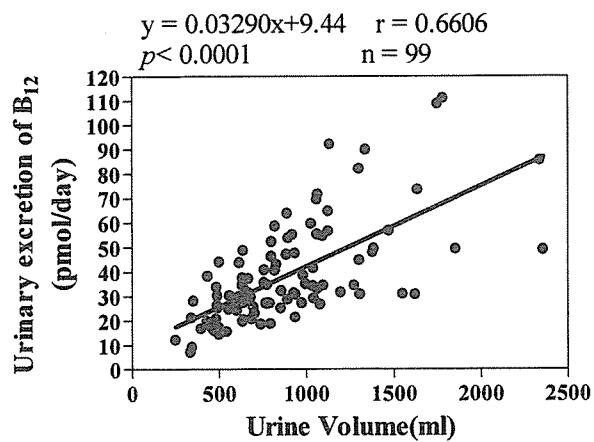


図 11. 尿量と尿中ビタミン B₁₂ 排泄量との関係

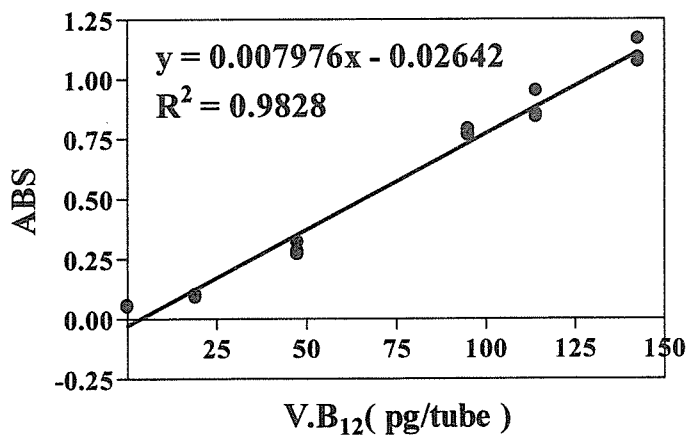


図 12. シアノコバラミン相当量に対する *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830 (*Lactobacillus - leichmanii*) のレスポンスの一例

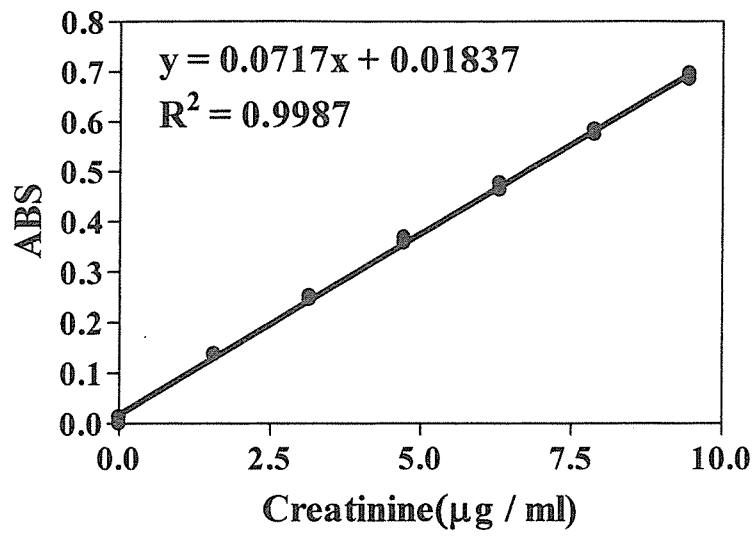


図 13. クレアチニンの検量線の一例

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）の策定に関する基礎的研究

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

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

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究協力者 福渡 努 滋賀県立大学 助手

研究要旨

水溶性ビタミン摂取量の違いによって、各水溶性ビタミンの尿中排泄量および血中濃度がどのように変動するか、ヒトを対象として調べた。被験者として 19～25 歳の健康な男性 8 名を用いた。被験者には、1 週目は通常食（組成が日本人の食事摂取基準 2005 年版にほぼ従った食事）を与え、2, 3, 4 週目には水溶性ビタミンが日本人の食事摂取基準（2005 年版）に示された推奨量の 1 倍、3 倍、6 倍量となる遊離ビタミンを通常食に加えてそれぞれ与えた。各週の最終日に 24 時間尿を採取し、尿中および血中における 9 種類の水溶性ビタミン含量を測定した。ビタミン B₁₂ を除く 8 種の水溶性ビタミンについて、ビタミン摂取によって尿中排泄量が摂取量依存的に増加した。また、ビタミン摂取によって血中のリボフラビン、ピリドキサーリン酸、ビタミン B₁₂、総ニコチンアミド、総パントテン酸、葉酸濃度が上昇した。

A. 目的

日本人の食事摂取基準（2005年版）において、ビタミンCを除く8種の水溶性ビタミンについては欠乏症を予防するという観点から、ビタミンCについては生活習慣病の予防という観点から、食事摂取基準が策定された¹⁾。ビタミンCについて生活習慣病予防の観点から食事摂取基準を策定できた理由の一つに、30~2500 mgのビタミンCを被験者に与え、各摂取量におけるビタミンC尿中排泄量および血中ビタミンC濃度を詳細に調べることにより、ビタミンCの代謝動態や体内飽和量などをLevineらが明らかにしたことが挙げられる^{2,3)}。ビタミンC以外の水溶性ビタミンについても摂取量と尿中排泄量との関係を明らかにするために、平成15年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究」において、女子学生を対象として通常食および通常食に第六次改定日本人の栄養所要量⁴⁾に記載された所要量の1~6倍の水溶性ビタミンを摂取させたときの各水溶性ビタミン尿中排泄量が調べられた⁵⁾。本研究では、男性を対象として、水溶性ビタミンの摂取量と尿中排泄量および血中濃度との関係について調べた。

B. 実験方法

1. 被験者

飲酒、喫煙の習慣がなく、医薬品や栄養補助食品を常用していない健康な19~25歳の男子学生8名を被験者とした。各被験者の年齢、身長、体重、BMIを表1に示した。本研究は滋賀県立大学倫理審査委員会において承認を受けたものである。

2. 食事

日本人の食事摂取基準（2005年版）に記載された身体活動レベルII、18~29歳の男性の食事摂取基準に従い¹⁾、栄養素組成が推奨量に近い食事を規定食として被験者に与えた。栄養素組成は五訂日本標準食品成分を用いて計算した⁶⁾（表2）。

3. 実験計画

概略を図1に示した。実験期間中、被験者は午前6時30分に起床し、午後11時30分に就寝した。朝食は午前8時より30分間、昼食は午後12時より30分間、夕食は午後6時より30分間、間食は午後9時30分より10分間とした。各週のDay1からDay4の4日間は被験者は表2に示した食事を摂取し、水分は指定のミネラルウォーターを自由摂取とした。各週のDay5からDay7は自由摂取とした。1週目のDay5から2週目のDay4までの7日間は表3の2週目に示したビタミン混合を、2週目のDay5から3週目のDay4までの7日間は表3の3週目に示したビタミン混合を、3週目のDay5から4週目のDay4までの7日間は表3の4週目に示したビタミン混合を摂取した。ビタミン混合は1日分を3等分し、朝食後、昼食後、夕食後に摂取した。

各週Day5の朝食前に静脈より採血した。測定するビタミン毎に全血、血清あるいは血漿を処理し、使用するまで-20℃で保存した。

各週Day4の2回目の尿からDay5の1回目の尿までを採取し、これを1日尿とした。1日尿の容量を測定し、測定するビタミン毎に安定化处理し、使用するまで-20℃で保存した。