

4. 分析

尿中チアミン量を測定するために、尿 9 ml に 1M HCl を 1 ml 加えて安定化した。この尿を 0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Cosmosil 5C₁₈-MS-II (ϕ 4.6 x 250 mm), 移動相および流速：0.2 M NaH₂PO₄-アセトニトリル (99.7 : 0.3, v/v), 1.0 ml/min, 反応液：0.05% K₃Fe(CN)₆, 0.5 ml/min および 15% NaOH, 0.5 ml/min, カラム温度：40°C, 反応コイル温度：50°C, 検出器：蛍光光度計, 励起波長 375 nm, 蛍光波長 450 nm とし、ポストカラム法を用いた。

血中総リボフラビン濃度は、リボフラビン, FMN, FAD をルミフラビンに光分解し、ルミフラビン量を測定することにより総リボフラビン量とした。採血後、直ちに全血 500 μ l を氷冷水 500 μ l を加え、よく混和した。この試料 200 μ l に 340 μ l の水と 260 μ l の 0.5 M 硫酸を加えて、80°C で 15 分間加熱した。冷却後、200 μ l の 10% TCA を加え、遠心分離した。遠心上清 200 μ l に 200 μ l の 1 M NaOH を加え、10 W 蛍光灯下で 5°C, 30 分間、光照射を行った。酢酸 20 μ l を混和後、0.45 μ m フィルターで濾過し、100 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：TSKgel ODS-80Ts (ϕ 4.6 x 250 mm), 移動相：10 mM NaH₂PO₄ (pH 5.5)-メタノール (65 : 35, 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。

尿中リボフラビン量を測定するために、尿 9 ml に 1M HCl を 1 ml 加えて安定化した。この尿を 0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：TSKgel ODS-80Ts (ϕ 4.6 x 250 mm),

移動相：10 mM NaH₂PO₄ (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。

血清ピリドキサーリン酸 (PLP) 濃度を測定するために、血清 300 μ l に 300 μ l の 5% メタリン酸溶液を加えてよく混和し、遠心分離した。遠心上清にジクロロメタン 300 μ l を加えてよく混和し、その遠心上清を 0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Hypersil BDS-5C18 (ϕ 3 x 150 mm), 移動相および流速：50 mM NaH₂PO₄ (pH 3.1)-0.2%アセトニトリル, 0.7 ml/min, 反応液：0.2%NaClO₂, 0.1 ml/min, カラム温度：40°C, 反応コイル温度：75°C, 検出器：蛍光光度計, 励起波長 325 nm, 蛍光波長 425 nm とした。

尿中 4-ピリドキシン酸量を測定するために、尿 9 ml に 1M HCl を 1 ml 加えて安定化した。この尿を 0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：TSKgel ODS-120A (ϕ 4.6 x 250 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。

血清ビタミン B₁₂ 濃度を求めるために、血清 50 μ l に 250 μ l の 570 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5), 水 500 μ l, 0.05%シアン化カリウム溶液 10 μ l を加え、100°C で 30 分間加熱した。氷冷後、15 μ l の 10%メタリン酸溶液, 水 175 μ l を加え、遠心分離で得られた上清を微生物学的定量法に供した。その方法は、サンプルを含むビタミン B₁₂ 定量用基礎培地 (日水製薬株式会社) 2 ml に *Lactobacillus leichmanii*, ATCC 7830 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。

尿中ビタミン B₁₂ 量を求めるために、尿 900 μ l に 180 μ l の 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8)、水 680 μ l、0.025% シアン化カリウム溶液 20 μ l を加え、120°C で 5 分間オートクレーブ処理した。氷冷後、20 μ l の 10% メタリン酸溶液を加え、遠心分離で得られた上清を上記の微生物学的定量法に供した。

血中総ニコチンアミド濃度を測定するために、採血後直ちに全血 75 μ l を 2 μ g/ml イソニコチンアミド溶液 1.425 ml に懸濁し、121°C で 10 分間オートクレーブ処理した。遠心上清 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 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：Chemcosorb 7-ODS-L (ϕ 4.6 x 250 mm)、移動相：10 mM KH₂PO₄ (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、ニコチンアミド量を算出した。

尿中ニコチンアミド代謝産物量はニコチンアミド、N¹-メチルニコチンアミド (MNA)、N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py)、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計とした。尿中総ニコチンアミド代謝産物量を測定するために、尿 9 ml に 1M HCl を 1 ml 加えて安定化した。尿中ニコチンアミド、2-Py、4-Py 各含量の測定として、安定化した尿 1 ml に炭酸カリウム 1.2 g を添加し、以降は上記の血中総ニコチンアミド濃度測定法と同じ操作を行った。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、安定化した尿 0.1 ml、水 0.7 ml、1 M 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、6 M 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 μ m フィルターで濾過し、20 μ l を HPLC による分析に供した。分析条件は、カラム：TSKgel ODS 80Ts (ϕ 4.6 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 (77.5 : 22.5, 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。

血中総パントテン酸を測定するために、採血後直ちに全血 0.5 ml に 4.5 ml の 50 mM KPB (pH 7.0) を加え、100°C で 5 分間加熱した。冷却後、遠心分離し、遠心上清 100 μ l に 50 μ l のハト肝アミダーゼ、50 μ l の 10U/ml ウシ小腸ホスファターゼ、50 μ l の 15 μ g/ml 還元グルタチオンを加えて、37°C で 24 時間反応させた。反応液に 1.25 ml の 50 mM KPB (pH 7.0) を加えて、100°C で 5 分間加熱し、冷却後の遠心上清を微生物学的定量法に供した。その方法は、サンプルを含むパントテン酸定量用基礎培地 (日水製薬株式会社) 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。

尿中パントテン酸量を測定するために、尿を上記の微生物学的定量法に供した。

血清葉酸濃度を測定するために、血清を微生物学的定量法に供した。その方法は、サン

ブル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。

尿中葉酸量を測定するために、尿 9 ml に 1M アスコルビン酸溶液を 1 ml 加えて安定化した。この尿を上記の微生物学的定量法に供した。

血清総ビオチン濃度を測定するために、37°C で 1 時間放置した血清 50 μ l に水 1 ml を加えて、100°C で 5 分間加熱し、冷却後、遠心分離した。その遠心上清を微生物学的定量法に供した。その方法は、サンプルを含むビオチン定量用基礎培地 (日水製薬株式会社) 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。

尿中ビオチン量を測定するために、尿を上記の微生物学的定量法に供した。

血漿アスコルビン酸濃度はアスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸、2,3-ジケトグルコン酸の合計とした。血漿アスコルビン酸濃度を測定するために、血漿 150 μ l に 10%メタリン酸溶液 150 μ l を加え、よく混和した後、遠心分離した。この遠心上清 100 μ l に 0.2% 2,6-ジクロロインドフェノール 100 μ l, 1%塩化スズ-5%メタリン酸 50 μ l, 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 M 硫酸 120 μ l を加えて混和し、50°C で 1.5 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 μ l を蒸発乾固させ、乾固物をアセトニトリル 200 μ l に溶解し、0.45 μ m フィルターで濾過し、20 μ l 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 (ϕ 3.9 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。

尿中アスコルビン酸量はアスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸、2,3-ジケトグルコン酸の合計とした。尿中アスコルビン酸量を測定するために、尿 5ml に 10%メタリン酸溶液 5 ml を加えて安定化した。安定化した尿 200 μ l に 0.2% 2,6-ジクロロインドフェノール 100 μ l, 1%塩化スズ-5%メタリン酸 50 μ l, 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン-4.5 M 硫酸 120 μ l を加え、以降、上記の方法によってサンプルを調製し、HPLC による分析に供した。

5. 統計処理

各週の比較には繰返しのある一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った。p 値が 0.05 以下のとき、統計的有意差があるものとした。計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 4 を使用した。

C. 結果

1. 血中ビタミン濃度

血中総ビタミン B₂ 濃度は、通常食摂取すなわち 1.7 mg/日のビタミン B₂ 摂取時と比べ、6.5 mg/日の摂取によって 1.2 倍に、11.3 mg/日の摂取によって 1.5 倍に上昇した (図 2A)。

血清 PLP 濃度は、通常食摂取すなわち 1.1 mg/日のビタミン B₆ 摂取時と比べ、5.3 mg/日の摂取によって 2.4 倍に、8.4 mg/日の摂取によって 3.8 倍に上昇した (図 2B)。

血清ビタミン B₁₂ 濃度は、通常食摂取すなわち 13 μ g/日のビタミン B₁₂ 摂取時と比べ、28 μ g/日の摂取によって 1.5 倍に上昇した

(図 2C).

血中総ニコチンアミド濃度は、通常食摂取すなわち 29 mgNE/日のナイアシン摂取時と比べ、119 mg/日の摂取によって 1.2 倍に上昇した (図 2D).

血清総パントテン酸濃度は、通常食摂取すなわち 6.8 mg/日のパントテン酸摂取時と比べ、25 mg/日の摂取によって 2.0 倍に、43 mg/日の摂取によって 2.1 倍に上昇した (図 2E).

血清葉酸濃度は、通常食摂取すなわち 0.37 mg/日の葉酸摂取時と比べ、1.1 mg/日の摂取によって 1.5 倍に、1.8 mg/日の摂取によって 2.0 倍に上昇した (図 2F).

血清総ビオチン濃度には、344 μ g/日のビオチンを摂取しても、通常食摂取すなわち 44 μ g/日の摂取時と比べ、変動は認められなかった (図 2G).

血漿アスコルビン酸濃度には、725 mg/日のアスコルビン酸を摂取しても、通常食摂取すなわち 125 mg/日の摂取時と比べ、変動は認められなかった (図 2H).

2. 水溶性ビタミン尿中排泄量

尿中チアミン排泄量は、通常食摂取すなわち 1.1 mg/日のビタミン B₁ 摂取時と比べ、5.1 mg/日のチアミン摂取によって 12 倍に、9.3 mg/日の摂取によって 18 倍にと直線的に増加した (図 3A).

尿中リボフラビン排泄量は、通常食摂取すなわち 1.7 mg/日のビタミン B₂ 摂取時と比べ、3.3 mg/日の摂取によって 4 倍に、6.5 mg/日の摂取によって 8 倍に、11.3 mg/日の摂取によって 18 倍にと直線的に増加した (図 3B).

尿中 4-ピリドキシン酸排泄量は、通常食摂取すなわち 1.1 mg/日のビタミン B₆ 摂取時と比べ、2.5 mg/日の摂取によって 1.7 倍に、5.3

mg/日の摂取によって 5 倍に、9.5 mg/日の摂取によって 8 倍にと直線的に増加した (図 3C).

尿中ビタミン B₁₂ 排泄量には、28 μ g/日のビタミン B₁₂ を摂取しても、通常食摂取すなわち 13 μ g/日の摂取時と比べ、変化は認められなかった (図 3D).

尿中総ニコチンアミド代謝産物排泄量は、通常食摂取すなわち 29 mgNE/日のナイアシン摂取時と比べ、44 mgNE/日の摂取によって 1.7 倍に、74 mgNE/日の摂取によって 3.3 倍に、119 mgNE/日の摂取によって 5 倍にと直線的に増加した (図 3E).

尿中パントテン酸排泄量は、通常食摂取すなわち 6.8 mg/日のパントテン酸摂取時と比べ、25 mg/日の摂取によって 2.6 倍に、43 mg/日の摂取によって 4.5 倍にと直線的に増加した (図 3F).

尿中葉酸排泄量は、通常食摂取すなわち 0.37 mg/日の葉酸摂取時と比べ、1.1 mg/日の摂取によって 8 倍に増加し、1.8 mg/日の摂取によって 39 倍にと急激に増加した (図 3G).

尿中ビオチン排泄量は、通常食摂取すなわち 44 μ g/日のビオチン摂取時と比べ、94 μ g/日の摂取によって 1.8 倍に、194 μ g/日の摂取によって 3.4 倍に、344 μ g/日の摂取によって 6 倍にと直線的に増加した (図 3H).

尿中アスコルビン酸排泄量は、通常食摂取すなわち 125 mg/日のアスコルビン酸摂取時と比べ、225 mg/日の摂取によって 1.8 倍に、425 mg/日の摂取によって 5 倍に、725 mg/日の摂取によって 7 倍にと直線的に増加した (図 3I).

D. 考察

本実験において、日本人の食事摂取基準

(2005年版)に記載された推奨量¹⁾の3倍以上のリボフラビン、ピリドキシン、パントテン酸、プテロイルモノグルタミン酸を通常食に付加すると、血中総リボフラビン、血清PLP、血清総パントテン酸、血清葉酸濃度が上昇した。また、推奨量の6倍のシアノコバラミン、ニコチンアミドを付加すると、血清ビタミンB₁₂、血中総ニコチンアミド濃度が上昇した。一般的な食事に加えて54 mg/日のチアミン、25 mg/日のリボフラビン、135 mg/日のビタミンB₆、48 µg/日のビタミンB₁₂、62 mg/日のパントテン酸を6週間摂取させた研究では、ビタミン摂取前と比較して血中チアミン濃度は1.4倍に、血中リボフラビン濃度は1.4倍に、血漿ビタミンB₆濃度は2.3倍に、血中ビタミンB₁₂濃度は1.5倍に、血中パントテン酸濃度は1.3倍に上昇した⁷⁾。この報告は本実験結果と一致するものである。リボフラビン摂取による血漿リボフラビン変動を調べた研究では、20 mgのリボフラビンを単回経口摂取すると、1.5時間後には血漿リボフラビン濃度は摂取前の値の16倍に上昇して最高値を示し、11時間後には1.5倍、24時間後には摂取前と同じ値となった⁸⁾。本実験ではビタミン混合を1日3回に分けて摂取したことから、リボフラビン摂取により一過性に血中レベルが上昇し、それが1日3回続いたことによって上昇した血中レベルを保った可能性が考えられる。他のビタミンについても同様の可能性が考えられる。

本実験では、日本人の食事摂取基準(2005年版)に記載された推奨量¹⁾の6倍のビオチン、アスコルビン酸を摂取しても、血清総ビオチン、血漿アスコルビン酸濃度には変動は認められなかった。様々な量のアスコルビン酸を摂取したときの血漿アスコルビン酸濃

度を調べた研究では、アスコルビン酸摂取量と血漿アスコルビン酸濃度との関係はシグモイド曲線を描き、直線的な関係は30~100 mg/日のアスコルビン酸を摂取したときに見られ、200 mg/日のアスコルビン酸摂取では血漿アスコルビン酸濃度はほぼ飽和値を示した^{2,3)}。本実験において通常食にアスコルビン酸を付加しても血漿アスコルビン酸濃度が変動しなかったことは、これらの報告と一致するものである。しかし、一般的な食事に加えて396 µg/日のビオチンを6週間摂取させた研究では、ビオチン摂取前と比較して血中ビオチン濃度は1.3倍に上昇した⁷⁾。この報告は本実験結果と異なるが、その増加が1.3倍と僅かであること、本実験で付加したビオチン量が最大300 µg/日であったことを考えると、さらにビオチンを付加すれば血清総ビオチン濃度に変動が見られたかもしれない。推奨量の6倍量の水溶性ビタミンを摂取したときに血中レベルが上昇したビタミンと変動しなかったビタミンとがあった。このような違いが見られた理由は明らかではないが、ビタミンの種類による吸収、体内循環、体内分布、代謝、再利用、排泄などの機構の違いが影響することが考えられる。

本実験において、ビタミンB₁₂を除く8種類の水溶性ビタミンの尿中排泄量は、摂取量依存的に直線的な増加を示した。シアノコバラミン摂取による尿中ビタミンB₁₂排泄量の増加は認められなかったが、これはビタミンB₁₂の主要な排泄経路は尿ではなく、胆汁であることによる。尿中葉酸排泄量は1.44 mg/日のプテロイルモノグルタミン酸付加によって急激に増加した。その変曲点は0.95 mg/日の葉酸摂取であり、女子学生を対象とした同様の実験から得られた0.78 mg/日とほぼ同

じ値を示した⁵⁾。女子学生を対象とした同様の実験では葉酸以外にも尿中のチアミン、リボフラビン、4-ピリドキシン酸、総ニコチンアミド代謝産物、パントテン酸、アスコルビン酸の排泄量について変曲点が認められたが⁵⁾、本実験では尿中排泄量に変曲点が認められたのは葉酸だけであった。このような違いが生じた理由は明らかではないが、変曲点が体内飽和値を表わすのであれば、体格、必要量、各組織の貯蔵量などが男女間では異なり、そのために飽和量が異なっている可能性が考えられる。

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. 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. 東京, 2004.

2. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KW, Park JB, Lazarev A, Graumlich JF, King J, Cantilena LR. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93, 3704-9.
3. Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98, 9842-6.
4. 厚生省. 第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—, 第六次改定日本人の栄養所要量策定検討会報告書. 東京, 1999.
5. 柴田克己, 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 15 年度総括・分担研究報告書. 2004.
6. 科学技術庁資源調査会編. 日本食品成分表の改定に関する調査報告—五訂日本標準食品成分表—大蔵印刷局, 東京, 2000.
7. Singh A, Moses FM, Deuster PA. Vitamin and mineral status in physically active men: effects of a high-potency supplement. *Am J Clin Nutr* (1992) 55.1-7.
8. Zempleni J, Galloway JR, McCormick DB. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* (1996) 63, 54-66.

表1 被験者の年齢, 身長, 体重, BMI

	年齢 (歳)	身長 (cm)	体重 (kg)	BMI
被験者 1	25	167.7	63.6	22.6
被験者 2	23	170.4	58.5	20.1
被験者 3	23	182.6	68.3	20.5
被験者 4	22	171.9	60.2	20.4
被験者 5	20	173.0	55.4	18.5
被験者 6	20	175.2	68.7	22.4
被験者 7	25	178.0	63.9	20.2
被験者 8	19	173.3	69.9	23.3
平均	22.1	174.0	63.6	21.0
標準偏差	2.3	4.6	5.2	1.6

表2 規定食の栄養素組成

	朝食	昼食	夕食	間食	合計
エネルギー (kcal)	654	971	827	195	2648
たんぱく質 (g)	28.6	30.8	32.0	6.1	97.5
脂質 (g)	24.1	36.7	19.4	6.5	86.7
炭水化物 (g)	81	125	127	28	361
脂溶性ビタミン ¹					
ビタミン A (μg)	152	166	271	65	653
ビタミン D (μg)	0.9	1.1	9.2	0.0	11.1
ビタミン E (mg)	1.66	2.26	4.50	0.28	8.69
ビタミン K (μg)	21	81	158	1	260
水溶性ビタミン ²					
ビタミン B ₁ (mg)	0.47	0.35	0.26	0.05	1.12
ビタミン B ₂ (mg)	0.56	0.73	0.33	0.10	1.72
ビタミン B ₆ (mg)	0.27	0.33	0.50	0.02	1.12
ビタミン B ₁₂ (μg)	1.0	2.7	8.8	0.8	13.3
ナイアシン (mgNE)	9.4	8.5	9.7	1.2	28.8
パントテン酸 (mg)	2.43	2.65	1.55	0.12	6.75
葉酸 (μg)	95	126	132	14	367
ビタミン C (mg)	36	37	45	7	125
ミネラル					
ナトリウム (mg)	1210	1769	745	337	4061
カリウム (mg)	848	402	725	201	2176
カルシウム (mg)	380	74	365	158	977
マグネシウム (mg)	80	59	154	5	297
リン (mg)	526	274	534	189	1523
鉄 (mg)	1.3	2.1	4.1	0.1	7.6
亜鉛 (mg)	2.7	3.0	3.8	0.8	10.3
銅 (mg)	0.23	0.42	0.77	0.02	1.44

¹ ビタミン A はレチノール当量として示した。

² ビタミン B₁ はチアミン塩酸塩相当量として、ビタミン B₆ はピリドキシン相当量として、ビタミン B₁₂ はシアノコバラミン相当量として示した。ナイアシンは、たんぱく質の 1% に 1/60 をかけた値と五訂日本食品標準成分表に記載されたナイアシン量の合計をナイアシン当量としてニコチン酸相当量で示した。

表3 ビタミン混合の1日当りの組成

	2週目	3週目	4週目
チアミン (mg)	1.4	4.2	8.4
リボフラビン (mg)	1.6	4.8	9.6
ピリドキシン (mg)	1.4	4.2	8.4
シアノコバラミン (μg)	2.4	7.2	14.4
ニコチンアミド (mg)	15	45	90
パントテン酸 (mg)	6	18	36
プテロイルモノグルタミン酸 (mg)	0.24	0.72	1.44
ビオチン (μg)	50	150	300
アスコルビン酸 (mg)	100	300	600

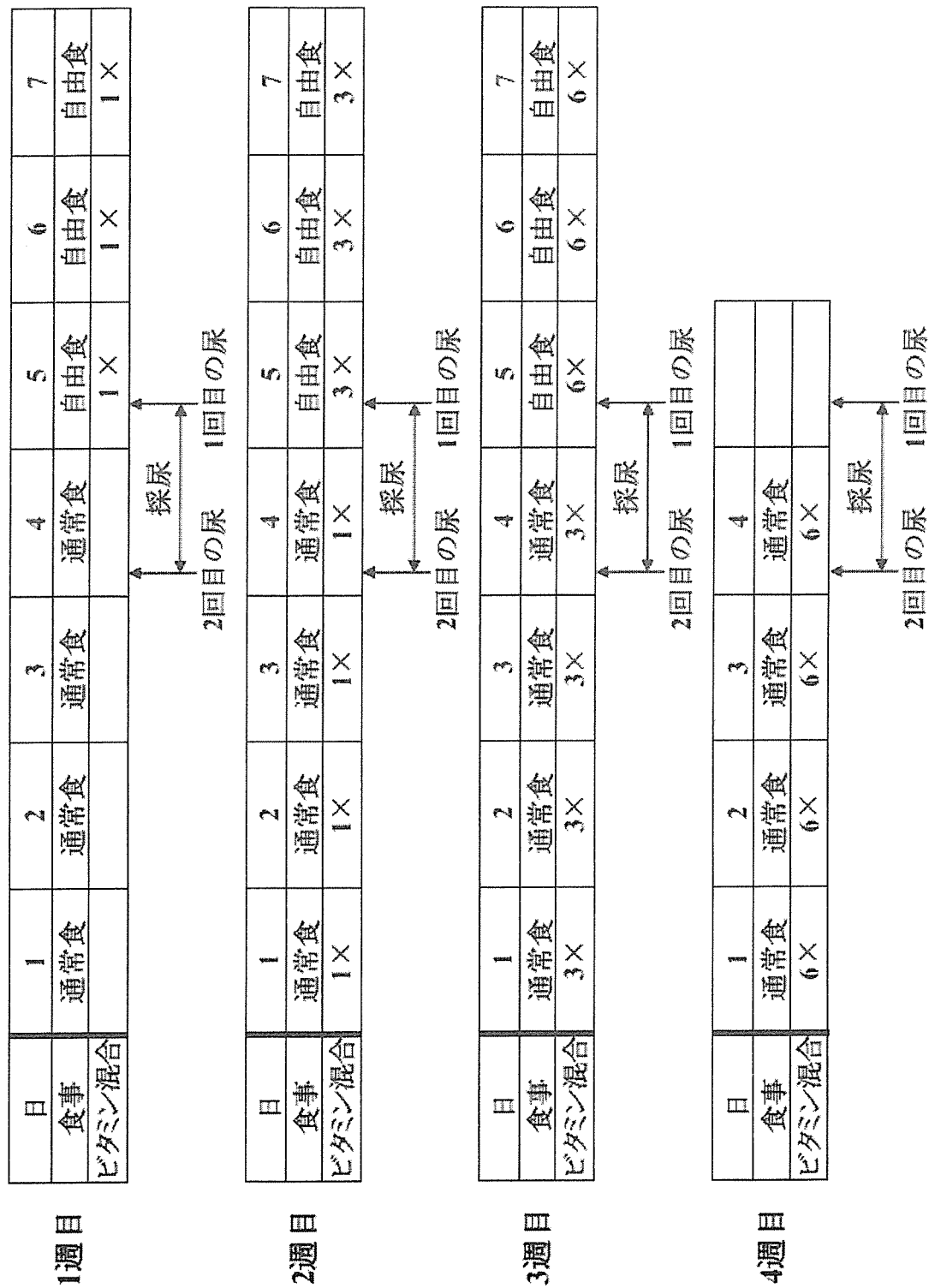
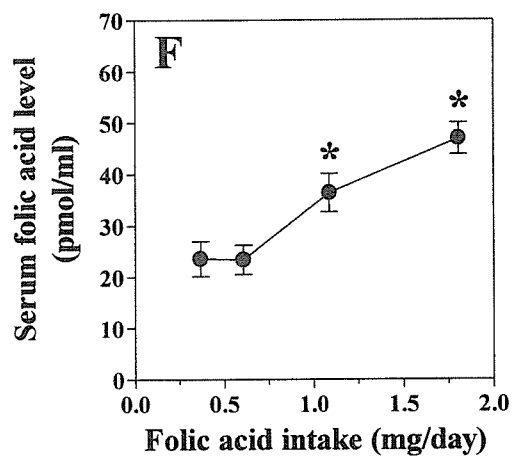
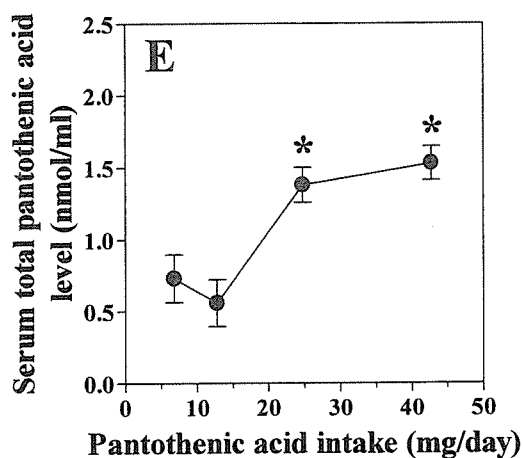
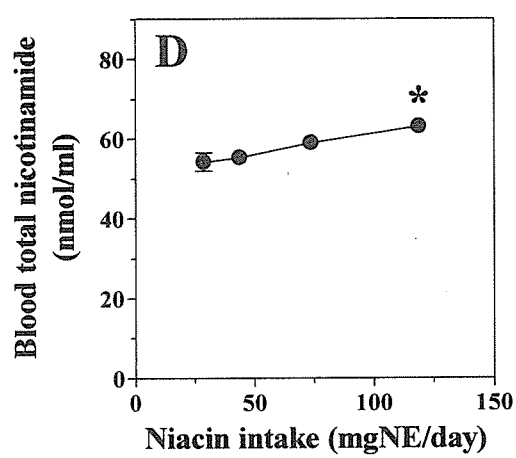
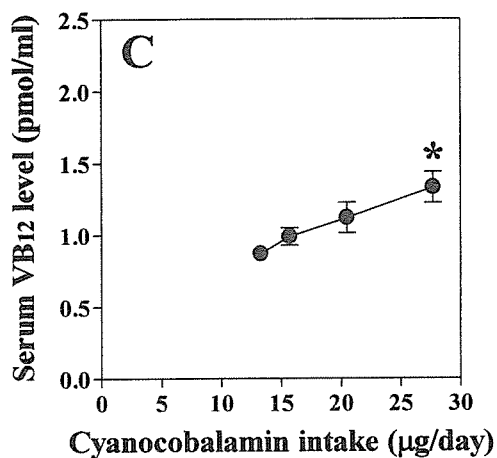
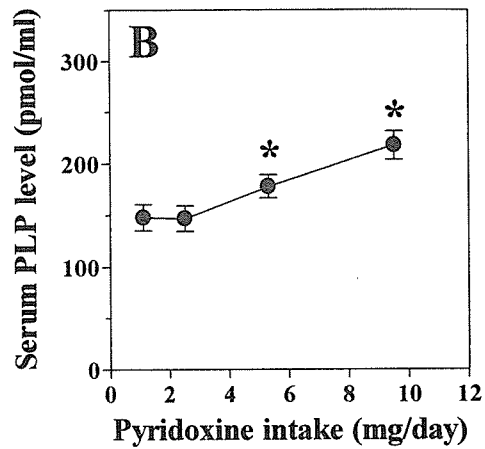
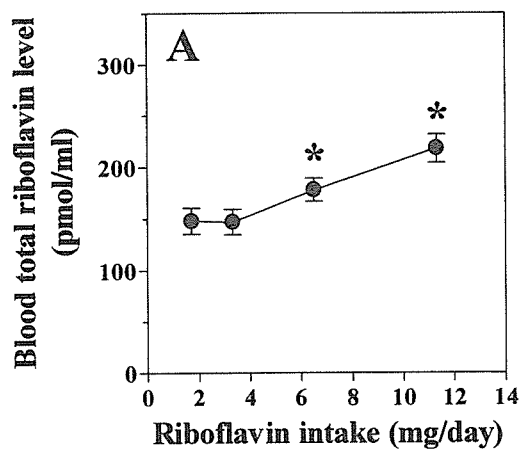


図1. ヒト試験の実験計画



次頁へ続く

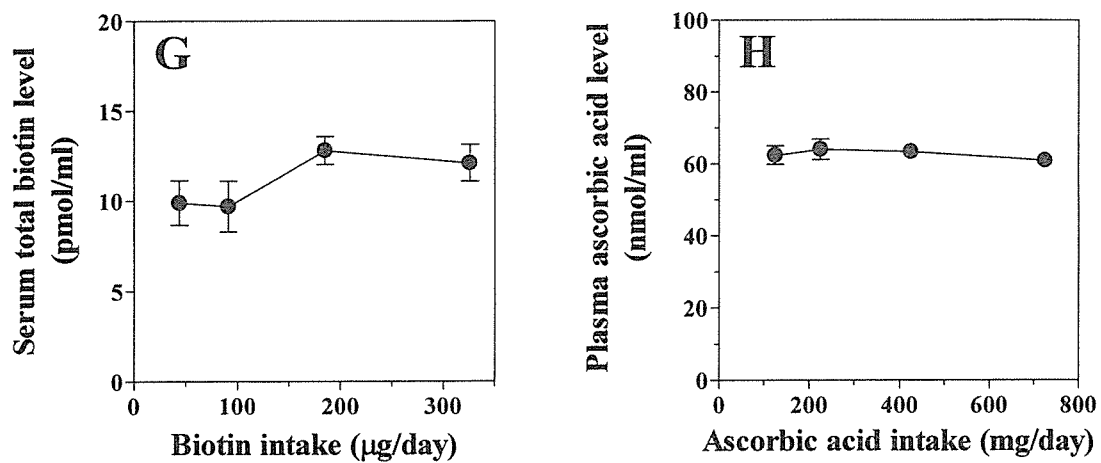
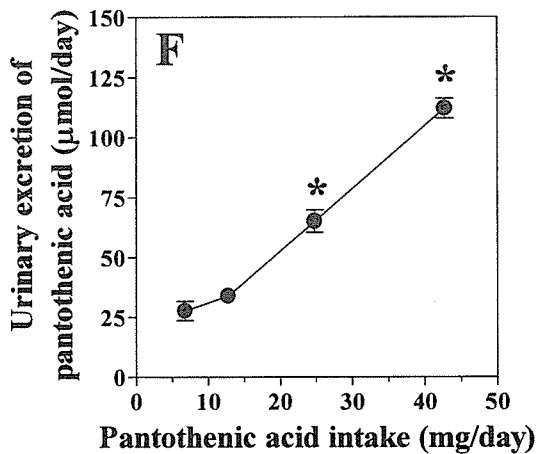
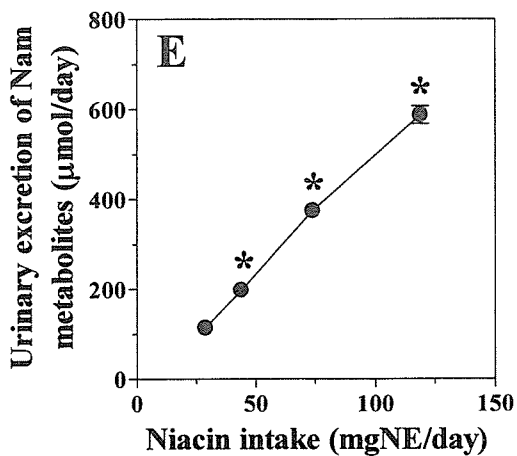
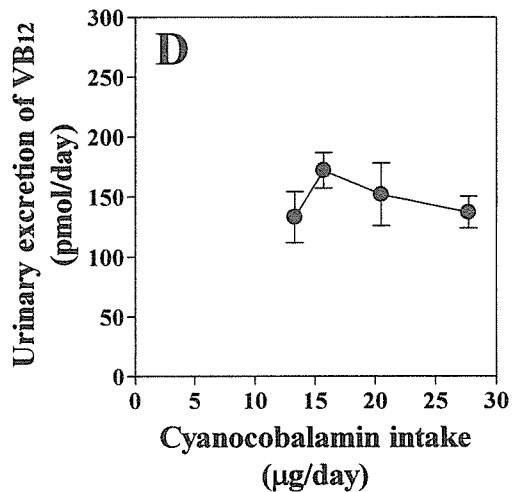
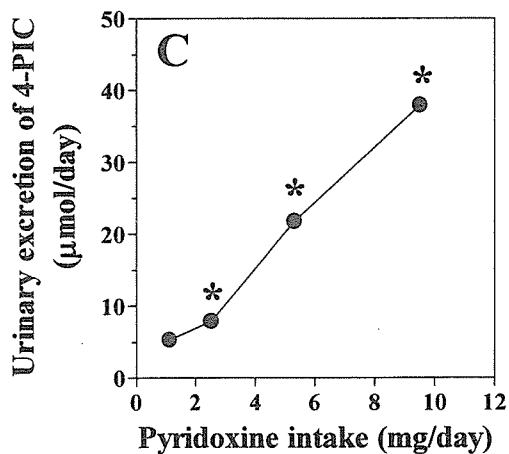
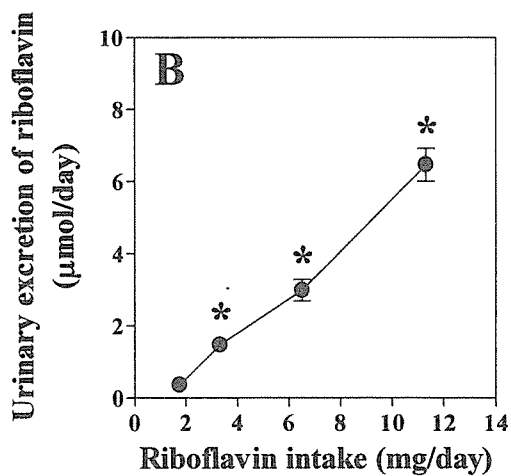
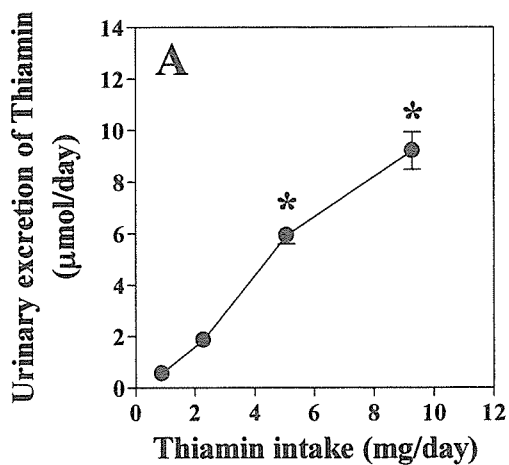


図2. 水溶性ビタミン摂取量と血中総リボフラビン (A), 血清 PLP (B), 血清ビタミン B₁₂ (C), 血中総ニコチンアミド (D), 血清総パントテン酸 (E), 血清葉酸 (F), 血清総ビオチン (G), 血漿アスコルビン酸 (H) との関係. 値は平均値 ± 標準誤差 (n = 8) として示した. *は通常食のみを摂取した時の値と有意差があることを示す ($p < 0.05$).



次頁へ続く

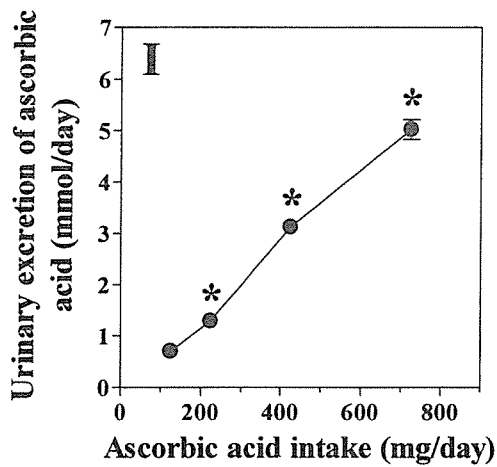
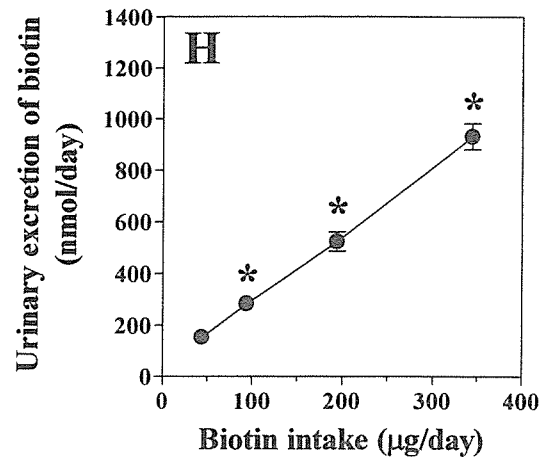
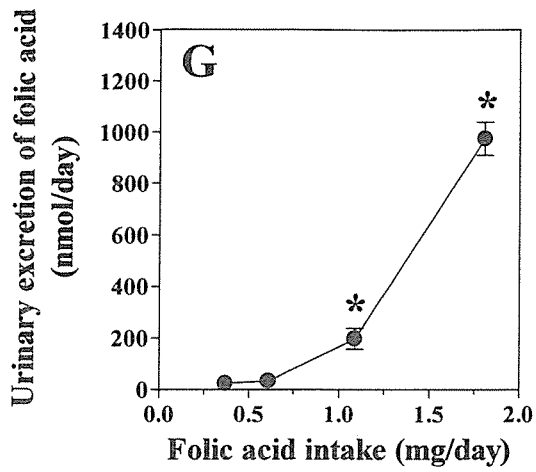


図3. 水溶性ビタミン摂取量と尿中チアミン (A), リボフラビン (B), 4-ピリドキシン酸 (C), ビタミン B₁₂ (D), 総ニコチンアミド代謝産物 (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H), アスコルビン酸 (I) との関係。値は平均値 ± 標準誤差 (n=8) として示した。*は通常食のみを摂取した時の値と有意差があることを示す ($p < 0.05$)。

II. 主任研究者の報告書

5. 絶食が水溶性ビタミンの尿中排泄量におよぼす影響

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

我々は尿中の水溶性ビタミンの排泄量を健康を維持するための栄養指標として利用する研究を行っている。尿によって栄養状態を正しく評価するためには、尿中の水溶性ビタミン排泄量がどのような要因によって変化するかという情報が必要である。我々はこれまでに水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量には非常に高い相関関係を有することを明らかにしてきた。しかしながら先行実験のラットでは、絶食した場合に尿中排泄量が増加するビタミンがあった。そこで本研究ではヒトにおいて絶食したときの尿中ビタミン排泄量の変化を、食事した場合と比較した。その結果、ビタミン B₆、パントテン酸、葉酸、ビオチン、ナイアシン、アスコルビン酸に関しては 1 日の絶食では変化は見られなかった。特徴的な現象として絶食時でビタミン B₁ の排泄量が約 1/3 に減少し、一方、ビタミン B₂ は約 4 倍に増加していた。これらの知見は、ビタミン B₁ の排泄量が極端に低く、かつビタミン B₂ の排泄量が極端に高い場合には、採尿日が絶食であった可能性を考慮する必要性を意味する。

A. 目的

我々は水溶性ビタミンの尿中排泄量を栄養指標として利用する研究を行っている。尿によって栄養状態を正しく評価するためには、尿中の水溶性ビタミン排泄量がどのような要因によって変化するのかという情報が必要である。

今回「1日絶食する」という要因が水溶性ビタミンの尿中排泄量にどのような影響を与えるかを調べた。絶食という要因にしたのは、1日絶食すると「食べていないなら当然尿中への水溶性ビタミンの排泄量は減少する」と考えられるが、本当に減少するのか実際に測定したことがなかったからである。

ヒトで実験を行う前にラットによる先行実験を行った。その結果、もしラットにおいて全てのビタミンで尿中排泄量が低下していれば、ヒトでの実験をする必要はなく、もしそれ以外の変化があればヒトで実験してみる価値があることになるからである。

B. 実験方法

1. ラットにおける先行実験

1-1. 飼育方法

8週齢のWistar系雄ラット5匹を日本クレア(株、東京)より購入し、1匹ずつラット用代謝ケージ(CT-10, 日本クレア株式会社、東京)に入れて13日間飼育した。

動物室は室温22°C、湿度60%、6時から18時が明、18時から6時が暗の明暗サイクルとした。

実験開始日をDay 1とし、毎日8時から10時の間に毎日世話をを行った。世話は体重

測定と水の交換を行った、Day 8まではさらに飼料摂取量の測定と飼料の交換も行った。

Day 8の9時まで飼料と水は自由摂取とし、Day 8の9時より飼料を与えず、飢餓状態にした。(ただし水は自由に摂取させた)

Day 5の9時より毎日24時間尿を採取し、Day 5~7を通常時の尿、Day 8~13を飢餓時の尿とした。

1-2. 採尿方法

三角フラスコに1M HClを1ml入れて、24時間採尿した。

24時間採尿終了後、0.1M HClでケージを洗い、すべての尿を採集し、使用するまで-20°Cで保存した。

1-3. 尿中水溶性ビタミンの測定方法

①ビタミンB₁

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¹⁾を改変した福渡らの方法²⁾に従って測定した。詳細はII-6.に記載した。

②ビタミンB₂

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³⁾。詳細はII-6.に記載した。

③ビタミンB₆

尿をそのまま測定用試料とした。ビタミンB₆の異化代謝産物である4-ピリドキシンの尿中排泄量の測定はHPLCで測定した⁴⁾。詳細はII-6.に記載した。

④ビタミンB₁₂

尿をそのまま測定用試料とした。尿中のビタミンB₁₂は*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. leichimannii*) ATCC 7830を用いた微生物学的定量法にて測定した⁵⁾。

詳細はⅡ-3.に記載した。

⑤ナイアシン

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^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) は柴田らによる HPLC 法に従って測定した⁶⁾。尿中 N^1 -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⁷⁾。詳細はⅡ-6.に記載した。

⑥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⁸⁾。詳細はⅡ-1.に記載した。

⑦ビオチン

ビオチンは 800×g, 5 分間遠心した上清を測定用試料とした。尿中のビオチンは、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法を用いて測定した^{9,10)}。詳細はⅡ-2.に記載した。

⑧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 27773 を用いた微生物定量法を用いて測定した^{11,12)}。詳細はⅡ-1.に記載した。

⑨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¹³⁾。詳細はⅡ-6.に記載した。

2. ヒトにおける実験

2-1. 方法

実験方法の概略を図 5 に示した。Day 1 は普段どおりの食事を摂ってもらい、この日に集めた尿に排泄された水溶性ビタミン量を対照値とした。そして絶食した Day 2 の尿中に排泄された水溶性ビタミン量を試験群とし、比較した。なお、尿は黒い遮光ボトルに集めた

2-2. 被験者

同意の得られた男性 3 名, 女性 9 名の計 12 名で行った。なお、本研究は滋賀県立大学倫理審査委員会の承認を得て行った。

1-3. 尿中水溶性ビタミンの測定方法

ラット尿と同様の測定方法で行った。

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。有意差検定には GraphPad Prism Ver. 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego California, USA) を用いた。検定は, unpaired t-test で行い, $p < 0.05$ で有意差が認められたと判断した。

C. 結果と考察

1. ラットにおける先行実験

摂食期

飼料を与えていた Day 7 までは毎日約 20 g 飼料を食べており, 1 日あたり約 4 g の体重増加が認められた(図 1)。

飢餓期

飼料を抜いた翌日 (Day 9) には約 15 g の割合で体重が減少し続けた (図 2)。

尿中排泄量

飢餓前 (Day 7) と飢餓後 (Day 8) の比較

を行った (図 3).

ビタミン B₁, ビタミン B₂, パントテン酸は飢餓時に尿中への排泄量の値が有意に減少していた。ビタミン B₆, 葉酸, ビオチン, ナイアシンでは飢餓時に尿中への排泄量が有意に増加していた。

Day 5 ~ Day 13 の間の尿中への水溶性ビタミンの変化を図 4 に示した。

ビタミン B₆, 葉酸, ビオチン, ナイアシンは一過性に増加した。飢餓が 2, 3 日続くと次第に減少していった。ビタミン B₁ は飢餓により急激に排泄量が検出限界近くまで低下し, 以降そのままの状態であった。ビタミン B₂, ビタミン B₁₂ の値は徐々に減少していった。

これらの結果より, ラットでは飢餓にさせて摂取量が 0 g となっても尿中への排泄量が増加するビタミンがあった。絶食という極端な食環境では尿中への排泄が必ずしも摂取量を反映しないこと明らかとなった。そこで同じような現象がヒトでも見られるか否かを調べた。

2. ヒトにおける実験

体重

体重は 1 日間絶食による体重の減少は, 個々人により異なり, 0.3 ~ 1.4 kg と幅が認められた (図 6)。

尿中クレアチニン量

絶食前後の尿中のクレアチニン排泄量を図 8 に示した。女性は 1 名を除いて絶食によって極端な低下は認められなかった。

水溶性ビタミンの尿中排泄量

ビタミン B₁ は絶食により摂食時の約 1/3 に減少した, 一方, ビタミン B₂ は絶食で摂

食時の約 4 倍に増加した。

ビタミン B₆, パントテン酸, 葉酸, ビオチン, ナイアシン, アスコルビン酸は絶食によっても尿中への排泄量の差異は認められなかった。

ビタミン B₁₂ は絶食時と摂食期の間で差がみられた。

体重減少率とビタミン B₁ とビタミン B₂ の排泄量の変化率においてビタミン B₁ に相関は見られなかったが, B₂ では相関が認められた。図 7 に体重減少率とビタミン B₁ と B₂ の排泄量の変化率を示す。

D. 考察

これらことから以下のことが考えられる。

ビタミン B₂ の値が高いヒトは単純に摂取量が多いということだけではないので, 評価する場合は絶食していた可能性を考慮に入れて評価し, 指導を行う必要がある。

ビタミン B₁ を 1 日摂取していないだけで尿中の値が顕著に下がるので, ビタミン B₁ は毎日必要量摂取した方がよい。

E. 健康危険情報

特になし

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. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. Lipid (1982) chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29-31
2. 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. *食衛誌* **45**, 231-238.
3. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1983) New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol. Chem* **258**, 5623-5628.
4. Gregory JF, Kirk JR (1979) Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr* **32**, 879-883.
5. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y (1998) Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric. Food. Chem* **46**, 5177-5180.
6. Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and

N¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **424**, 23-28.

7. Shibata K (1987)

Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* **61**, 599-604.

8. Skeggs HR, Wright LD.(1944) The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol. Chem* **156**, 21-26.

9. Wright LD, Skeggs HR (1944)

Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* **56**, 95-98.

10. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y (1994) Agar plate method using

Lactobacillus plantarum for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* **40**, 491-8.

11. Tamura T (1990) Microbiological assays of folates. In *Folic acid metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol.13 (Picciano MF, Stolstad ELR, Gregory JF III, eds) pp. 121-37, Wiley-Liss, New York, USA.

12. Tamura T. (1998) Determination of food folate. *J. Nutr. Biochem.* **9**, 285-293.

13. Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S (1992) Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* **64**, 1507.

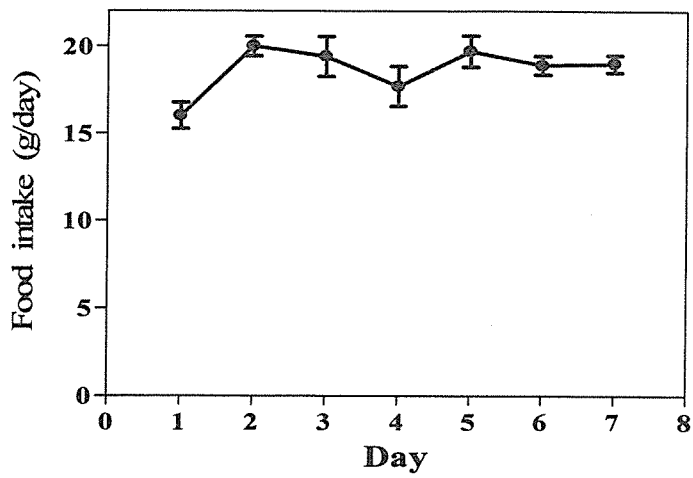


図1. 摂食期の飼料摂食量

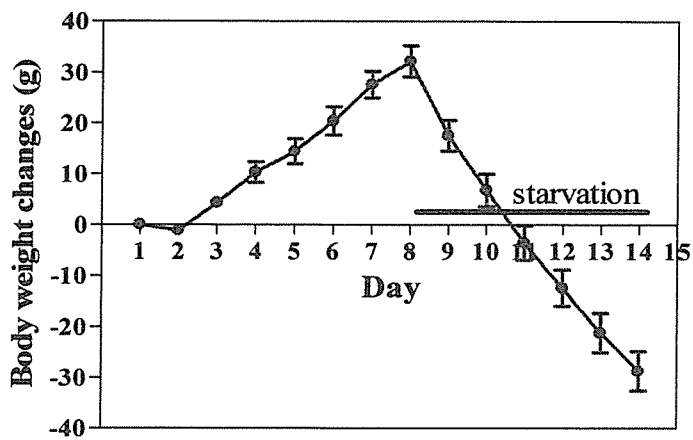


図2. 摂食期および飢餓期の体重変化量の推移

Day 1～Day 7まで飼料を与え、Day 8の午前9時に飼料を抜いた