

次頁に続く

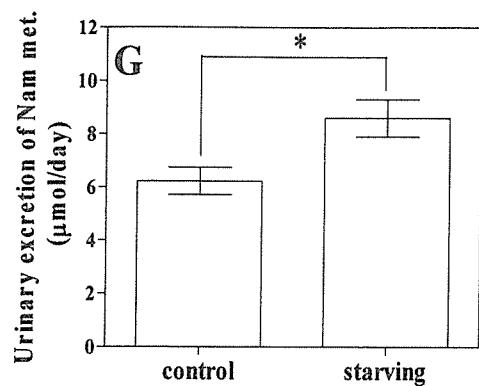
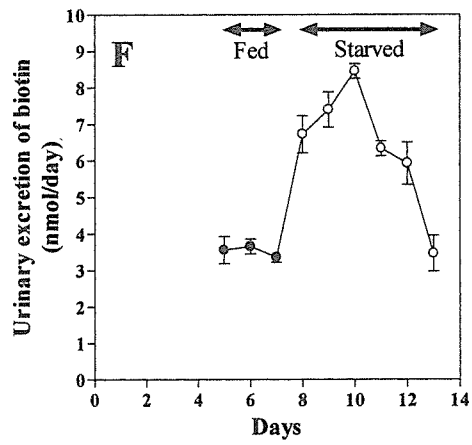
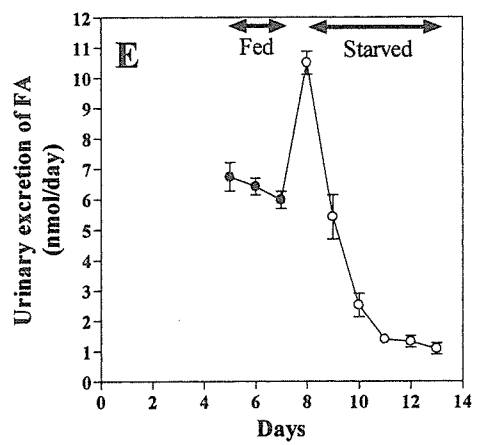
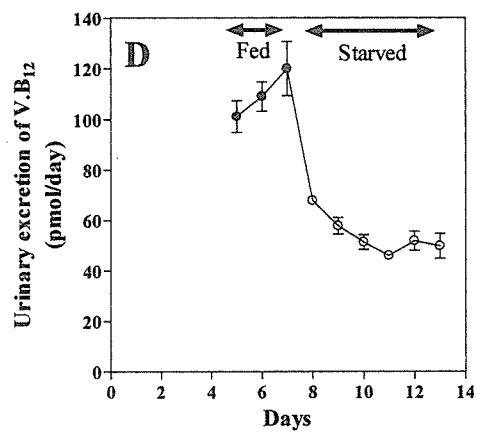
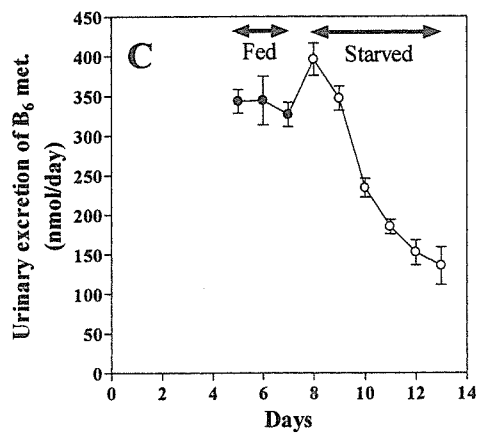
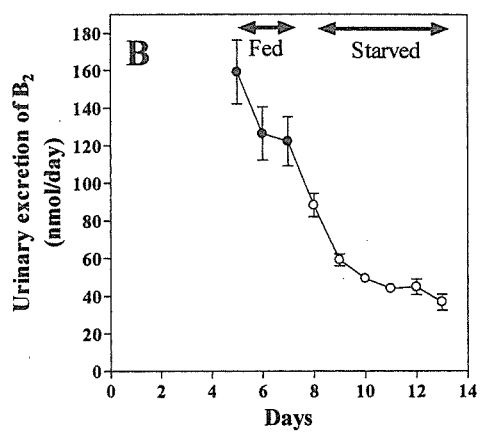
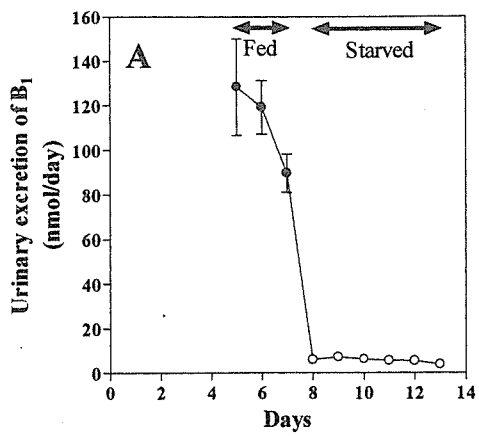


図3. ラットの飢餓前と飢餓後の尿中ビタミン排泄量比較

(A): ビタミンB₁の尿中排泄量 (B): ビタミンB₂の尿中排泄量 (C): ビタミンB₆の代謝産物4-PICの尿中排泄量 (D): パントテン酸の尿中排泄量 (E): 葉酸の尿中排泄量 (F): ビオチンの尿中排泄量 (G): ナイアシンの最終代謝産物であるMNA, 2-Py, 4-Pyの合量の尿中排泄量

Controlは飢餓前のDay 7の尿でstarvingは飢餓1日目のDay 8の尿の値である。値は平均値±SEM (n=5) で示した。*: p < 0.05.



次頁に続く

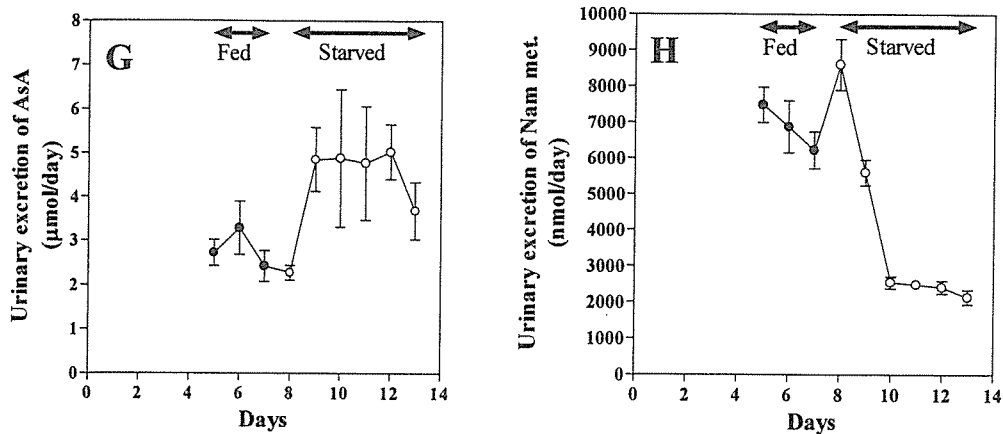


図4. 摂食期と飢餓期の水溶性ビタミンの尿中排泄量の変動

Day 5 ~ 7 は飢餓前の尿で Day8 ~ 13 は飼料なしの飢餓の尿の値である。(A): ビタミン B₁ の尿中排泄量 (B): ビタミン B₂ の尿中排泄量 (C): ビタミン B₆ の尿中排泄量 (D): ビタミン B₁₂ の尿中排泄量 (E): 葉酸の尿中排泄量 (F): ビオチンの尿中排泄量 (G): ビタミン C の尿中排泄量 (H): ナイアシンの尿中排泄量. 値は平均値 ± SEM (n=5).

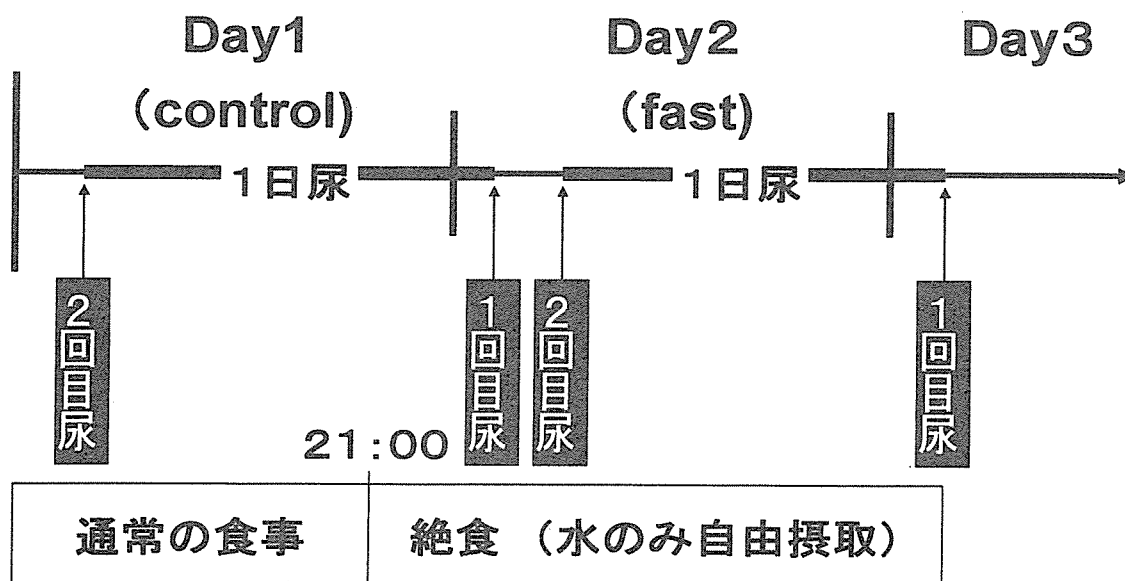


図5. ヒト実験計画の概略

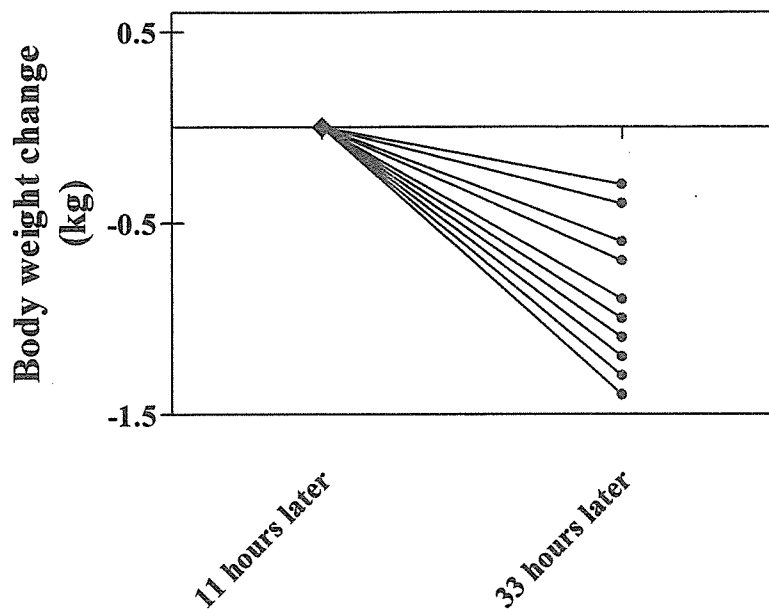


図 6. 絶食による体重変化

横軸は絶食開始 (Day 1 21:00)からの時間

11 hours later は早朝空腹時の体重計測であり、いわゆる個々人の正常時の体重を示し、この時の体重を基準とし、33 hours later は1日間絶食した翌早朝空腹時の体重計測との差を示す。

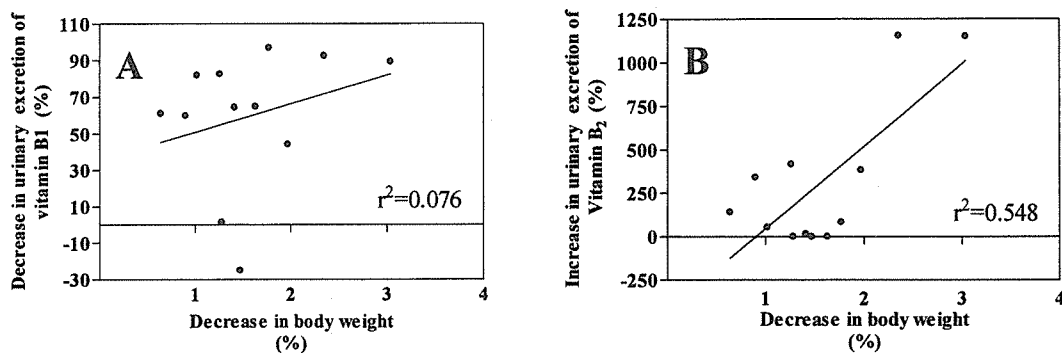


図 7. 体重の減少率とビタミン B₁, B₂ の変化率

(A): 縦軸はビタミン B₁ の減少率, 横軸は体重減少率, (B): 縦軸はビタミン B₂ の増加率, 横軸は体重減少率を示す。

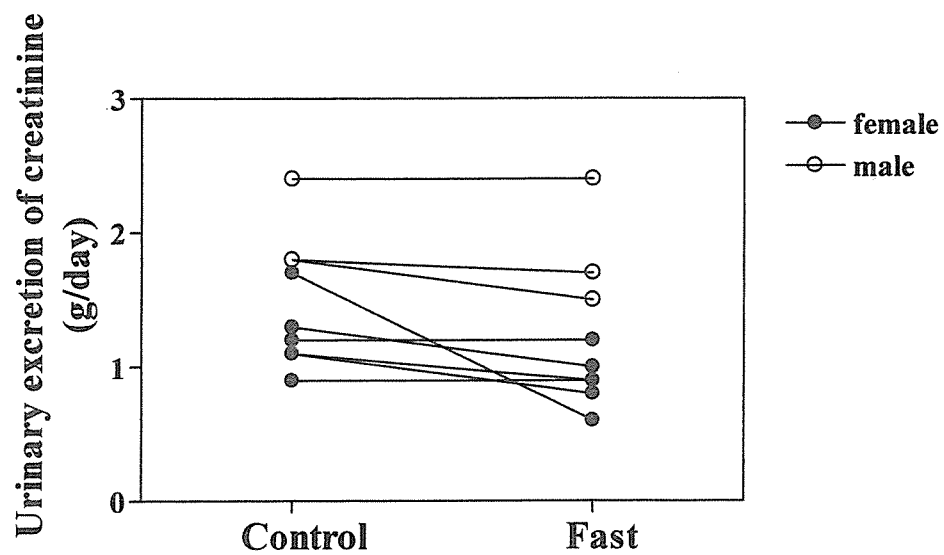
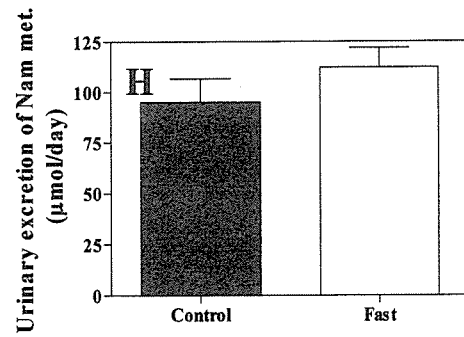
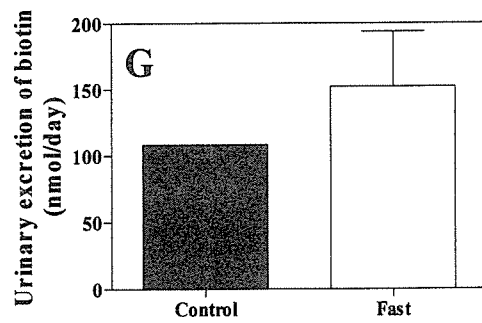
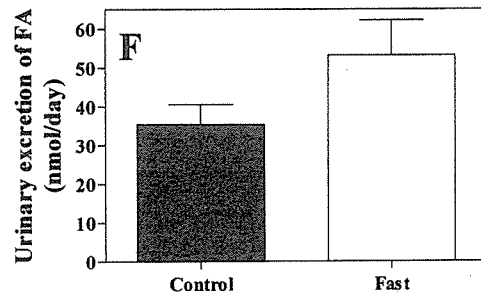
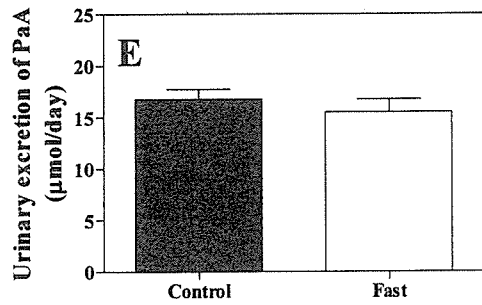
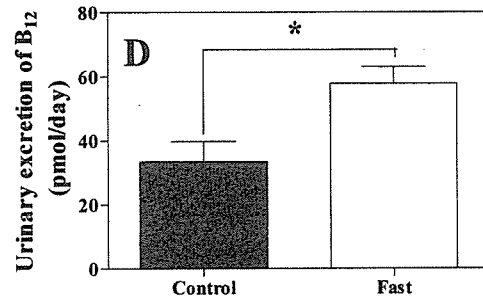
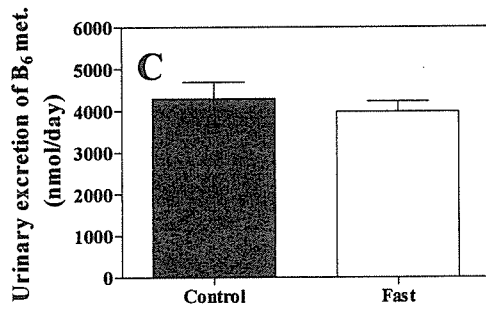
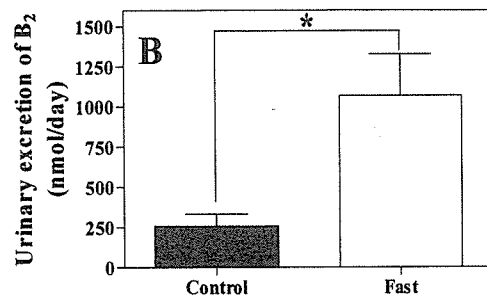
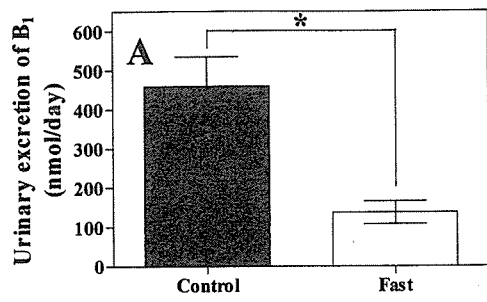


図8. 絶食前後における尿中クレアチニン排泄量 Control: 通常生活, Fast: 飢餓時.
male, female はそれぞれの基準値を示す. ○, male; ●, female.



次頁に続く

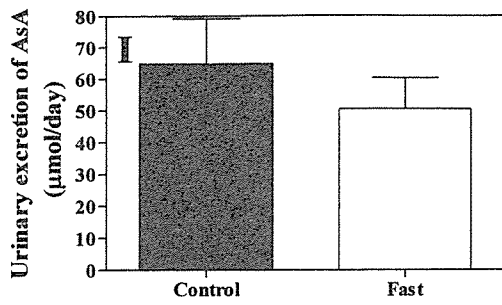


図 9. ヒトにおける摂食期 (Control) と絶食期 (Fast) の各水溶性ビタミン尿中排泄量比較

(A): ビタミン B₁ の尿中排泄量 (B): ビタミン B₂ の尿中排泄量 (C): ビタミン B₆ の異化代謝産物である 4-PIC の尿中排泄量 (D): ビタミン B₁₂ (E): パントテン酸の尿中排泄量 (F): 葉酸の尿中排泄量 (G): ビオチンの尿中排泄量 (H): ナイアシンの異化代謝産物である MNA, 2-Py, 4-Py の合計の尿中排泄量 (I): AsA の尿中排泄量 Control は絶食前の Day 1 の尿で (fast) は飢餓 1 日目の Day 2 尿の値である. *: $p < 0.05$.

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

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

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

水溶性ビタミンの適正尿中排泄量を指標として四施設の女子学生の水溶性ビタミンの栄養状態の評価を試みた。その結果、施設ごとの水溶性ビタミン排泄量の差異は、大きくなかったが、すべての水溶性ビタミンにおいて、適正排泄量以下のヒトが数多くみられた。ビタミン C においては、50%程度のヒトが適正排泄量以下であり、排泄量の変動も特に大きかった。逆にパントテン酸の尿中排泄量が適正值以下のヒトの割合が、一番少なく 15%程度であった。これらの事実は、まさに女子学生の食生活を反映している。従来は栄養素摂取量という食品側の情報のみによって栄養評価が試みられていたが、この評価方法は、生体側の情報を基にしたものであり、はじめての本格的な栄養評価といえる。

A. 目的

日本人の栄養素必要量を提言した「日本人の栄養所要量（2005年度からは食事摂取基準）」が、当時の厚生省の所轄事項となった1969年以来（1970年度～1974年度使用¹⁾、最新の科学的情報を盛り込むため、また、日本の食生活の変動を考慮して、適正な方向に向けるためなどから5年毎に改定されている。水溶性ビタミンでは、1969年にはビタミンB₁、ビタミンB₂、ナイアシン、ビタミンCのみであったが、1999年に策定された「第六次改定 日本人の栄養所要量－食事摂取基準－」（2000年度～2004年度使用²⁾では、9種類の水溶性ビタミンの食事摂取基準（栄養所要量）がすべて策定された。2004年に改定された「日本人の食事摂取基準（2005年版）（2005年度～2009年度使用³⁾においても、水溶性ビタミンの必要量（必要量＝欠乏を予防するために必要な最低摂取量）に関しては、本質的な数値の改定が必要ではなかった。「日本人の食事摂取基準（2005年版）の序文に「日本人の栄養所要量－食事摂取基準－策定検討会」の座長であった田中は、「人間を対象とした栄養素必要量に関する研究は、人的、時間的、経済的負担が非常に大きいので、新しい方法論（と問えば、分子栄養学の応用など）が確立されない限り、今後、あまり実施されないであろう」と記載している。国民健康・栄養調査では、食事摂取基準で策定された栄養素量を、ほぼ摂取している。言い換えると、日本では栄養素欠乏を克服したということであり、現在策定されている栄養素必要量は、ほぼ妥当であるということ

である。特に、ビタミンは明確な欠乏症が存在したために、栄養素の中でも必要量の説明が最も精度高く、策定されている。つまり、欠乏症を予防するための最低摂取量（＝必要量）の数値を求める実験は、ほぼ終了したということである。

現在の食事摂取基準を「是」とするならば、次のステップとして、栄養評価を行うための生体側の栄養指標の提言が必要である。そこで、我々は、健康人の栄養評価を行うために、生体側の情報として尿が適していることを主張している（図1, 2）。女子学生では、尿が鋭敏に水溶性ビタミン摂取量を反映することを報告した⁴⁾。これらの実験結果とすでに報告されている論文を参考にして、表1に示した健康女子学生の適正尿中排泄量を示した。これらの値を利用して、女子学生の水溶性ビタミンの栄養評価を試みた。

B. 実験方法

1. 被験者

本実験は各管理栄養士養成施設に属する女子学生に、研究目的を説明した上で、同意を得たものにつき調査対象にした。また、被験者には、ビタミン剤等の服用を尿採取日から1週間前から控えるよう指示した。

1-1. 施設-1の女子大学生29名について検討した。女子大学生の平均年齢は 19.9 ± 0.40 歳、平均身長 158.8 ± 5.8 cm、平均体重 52.4 ± 6.6 kgであった。

1-2. 施設-2の女子学生64名について検討した。女子学生の平均年齢は 19.4 ± 3.2 歳、平均身長 158.9 ± 6.1 cm、平均体重 52.7 ± 8.0

kgであった。

1-3. 施設-3 女子学生 132 名について検討した。女子学生の平均年齢は 19.9 ± 2.4 歳、平均身長 158.7 ± 5.0 cm, 平均体重 51.1 ± 5.7 kg であった。

1-4. 施設-4 は、女子学生 264 名について検討した。平均年齢、体重、身長データは入手しなかった。

2. 尿採取

尿は、調査日の起床すぐの尿は捨て、第 2 回目の尿から次の日の起床後すぐの第 1 回目の尿までを遮光のボトルに集めた。回収後、尿量を測定したのちにビタミンごとに表 2 に示した前処理を行い、分析まで -20°C で冷凍保存した。

3. 尿中の水溶性ビタミンの分析

ビタミン B₁

ビタミン B₁ の尿中の測定は、チアミンを測定した。測定方法は、木村らによる HPLC 法⁵⁾を改変した福渡らの方法⁶⁾による蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については表 3 に、構成図は図 3 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 0.1 M 塩酸

塩酸を 1 ml 採り、水を 115 ml 加えた。

② HPLC 用の移動相

りん酸二水素ナトリウム二水和物を 31.2 g 秤量し、水 800 ml に溶解した後、アセトニトリル 3 ml を加え、水にて全量を 1000 ml とした。

③ 0.05% フェリシアン化カリウム

フェリシアン化カリウムを 0.25 g 秤量し、水 500 ml に溶解してよく混和した。

④ 15%水酸化ナトリウム

水酸化ナトリウムを 75 g 秤量し、水 425 ml を徐々に加えて混和した。

(2) 標準溶液の調製

① チアミン塩酸塩 (和光純薬工業株式会社, 大阪) を 10 mg を秤量し、0.1 M 塩酸 10 ml に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 0.1 M 塩酸を加えてよく混和した。0.1 M 塩酸を対照として、この溶液の吸光度 (246 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{246\text{ nm}} = 14200$ より正確な濃度 (pmol) を求めた。これをチアミン標準溶液とした。

(3) サンプルの使用方法

測定試料である尿は、10000 rpm (9100 × g), 4°C で 5 分間遠心した後、マイクロフィルター (Millex-HV, 0.45 μm , 日本ミリポア株式会社, 東京) を通してろ過した。ろ液 20 μl を HPLC システムに注入した。チアミン標準溶液はそのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とした。

(4) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い、定量はチアミンのピーク面積による絶対検量線法によって行った。すなわち、チアミン標準溶液及び測定試料の測定より得られたチアミンのピーク面積をパーソナルコンピュータ (表計算ソフトウェア: Microsoft Excel) に入力し、以下の式に基づき尿中のチアミン濃度を求めた。

① チアミン標準溶液 20 μl を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 尿 20 μl を HPLC に流し、面積より以下

の計算式に基づき濃度を求めた。

ラット・マウスの場合 (nmol/day)
= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりのチアミン標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1/1000)^{*1} × 希釈倍率
ヒト尿の場合 (nmol/day)
= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりのチアミン標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1/1000)^{*1} × 希釈倍率 × (10/9)^{*2}

*1: 単位を pmol から nmol にするため

*2: 尿を 1 M HCl (9:1, v/v) に処理を行い保存しているため

ビタミン B₂

尿中のビタミン B₂ は、リボフラビン (Rf) を測定した。測定方法は、Ohkawa らの方法⁷⁾による、蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については、表 4 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 100 mM りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)

りん酸二水素カリウムを 6.8 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 500 ml とした。別はりん酸水素二カリウムを 8.7 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 500 ml とした。りん酸水素二カリウム溶液にりん酸二水素カリウム溶液を加えていき、pH を 7.0 に合わせた。

② 6 M 水酸化ナトリウム

水酸化ナトリウムを 24.0 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 100 ml とした。

③ 1 M りん酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5

りん酸二水素ナトリウム二水和物を 31.2

g 秤量し、水 170 ml に溶解した。6 M 水酸化ナトリウムを加えていき、pH を 5.5 に合わせた後、水を加えて全量を 200 ml した。

④ HPLC 用の移動相

7 ml の 1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5)、300 ml のメタノール及び 693 ml の水をよく混和した。

(2) 標準溶液の調製

① リボフラビン (分子量 376.36、和光純薬工業株式会社、大阪) を 10 mg 秤量し、10 ml の 0.1 M りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 0.1 M りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加えてよく混和した。0.1 M りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を対照として、この溶液の吸光度 (445 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{445\text{nm}} = 12500$ より正確な濃度 (μM) を求めた。この溶液を 0.1 ml 取り、0.9 ml の 0.1 M りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加えて混和した。これをリボフラビン標準溶液とした。

(3) サンプルの使用方法

測定試料である尿は、10000 rpm (9100×g)、4°C で 5 分間遠心した後、マイクロフィルター (Millex-HV, 0.45 μm , 日本ミリポア株式会社、東京) を通してろ過した。ろ液 20 μl を HPLC システムに注入した。Rf 標準溶液はそのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については 0.1 M りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にて希釈を行い測定試料とした。

(4) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い、定量は Rf のピーク面積による絶対検量線法

によって行った。すなわち、Rf 標準溶液及び測定試料の測定より得られた Rf のピーク面積をパーソナルコンピュータ (表計算ソフトウェア: Microsoft Excel) に入力し、以下の式に基づき尿中の Rf 濃度を求めた。

① Rf 標準溶液を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 尿を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

ラット・マウスの場合 (nmol/day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの Rf 標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1/1000)^{*1} × 希釈倍率

ヒト尿の場合 (nmol/day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの Rf 標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1/1000)^{*1} × 希釈倍率 × (10/9)^{*2}

*1: 単位を pmol から nmol にするため

*2: 尿を 1 M HCl (9:1, v/v) に処理を行い保存しているため

ビタミン B₆

ビタミン B₆ の尿中の測定には、異化代謝産物である 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) を測定した。測定方法は、Gregory と Kirk の方法⁸⁾による、蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については、表 5 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 0.1 M 塩酸

塩酸を 1 ml 採り、水を 115 ml 加えた。

② 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)

リン酸二水素カリウムを 6.8 g 秤量し、水

を加えて溶解した後、全量を 50 ml とした。

別によりん酸水素二カリウムを 8.7 g 秤量し、水を加えて溶解した後、全量を 50 ml とした。りん酸水素二カリウム溶液にりん酸二水素カリウム溶液を加えていき、pH を 7.5 に合わせた。pH メータを用いて、pH を合わせた溶液 5 ml を取り、水を加えて全量を 1000 ml とした。

③ 12.5 M 水酸化カリウム

水酸化カリウムを 50 g 秤量し、氷冷しながら約 50 ml の水で溶解した後、水を加えて全量を 100 ml とした。

④ HPLC 用の移動相

水 800 ml にりん酸 6.9 ml を添加し、次に 12.5 M 水酸化カリウムを加えて pH を 2.2 に合わせた後、水を加えて全量を 2700 ml とした。この緩衝液にメタノール 300 ml を加えてよく混和した。

(2) 標準溶液の調製

① 4-PIC (分子量 183.2, シグマアルドリッチジャパン株式会社, 東京) を 10 mg 秤量し、10 ml の 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した。

② ①を 0.1 ml 採り、9.9 ml の 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を加えてよく混和した。5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を対照として、この溶液の吸光度 (316 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{316\text{nm}} = 5970$ より正確な濃度 (pmol) を求めた。この溶液を 0.1 ml 採り、0.9 ml の 5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を加えて混和した。これを 4-PIC 標準溶液とした。

(3) サンプルの使用方法

測定試料である尿は、10000 rpm (9100×g),

4°Cで3分間遠心した後、マイクロフィルター (Millex-HV, 0.45 μm, 日本ミリポア株式会社, 東京) を通してろ過する。ろ液 20 μl を HPLC システムに注入した。4-PIC 標準溶液はそのまま各 20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とする。

(4) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い、定量は 4-PIC のピーク面積による絶対検量線法によって行った。すなわち、4-PIC 標準溶液及び測定試料の測定より得られた 4-PIC のピーク面積をパーソナルコンピュータ (表計算ソフトウェア: Microsoft Excel) に入力し、以下の式に基づき尿中の 4-PIC 濃度を求めた。

① 4-PIC 標準溶液を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 尿を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

ラット・マウスの場合 (nmol / day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの 4-PIC 標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1/1000)*¹ × 希釈倍率

ヒト尿の場合 (μmol / day)

= 測定試料の面積 / (1 pmol あたりの 4-PIC 標準面積) × (1 日の尿量) ml / (HPLC 試料注入量 0.02 ml) × (1/1000000)*² × 希釈倍率 × (10/9)*³

*¹: 単位を pmol から nmol にするため

*²: 単位を pmol から μmol にするため

*³: 尿を 1 M HCl (9 : 1, v/v) に処理を行い保存しているため

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⁹⁾。詳細は II-3. に記載した。

ナイアシン

ナイアシンの尿中の測定には、異化代謝産物であるニコチンアミド (Nam), 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) を測定した。Nam, 2-Py, 4-Py の測定方法は、Shibata K の方法¹⁰⁾による、UV 検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については、表 6 に示した。また、MNA の測定方法は、Shibata K の方法¹¹⁾による、蛍光検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については、表 7 に示した。

Nam, 2-Py, 4-Py

(1) 試薬類の調製方法

⑤ 1 M KH₂PO₄ (pH 3.0)

136.09 g の KH₂PO₄ を秤量し、水を 800 ml 加え、完全に溶解した。この液にリン酸を滴下し、pH メーターを使い、pH を 3.0 に調整した。そして、水で 1000 ml にした。

⑥ HPLC 用の移動相

水 990 ml に 1 M KH₂PO₄ 10 ml を添加し、次にアセトニトリルを 41.7 ml を加えてよく混和した。

(2) 標準溶液の調製

③ イソニコチンアミド標準

イソニコチンアミド (分子量 122.12. 和光純薬工業株式会社, 大阪) を 1.0 mg 秤量し, 水 1 ml に溶解した. この液を内部標準として尿サンプルを処理する時に, 使用した. またこの内部標準を, 0.1 ml 取り, 水を 4.9 ml 加え, 50 倍希釈した. これを標準液として使用した.

④ ニコチンアミド標準

ニコチンアミド (分子量 122.12. 和光純薬工業株式会社, 大阪) を 2.0 mg 秤量し, 水 2 ml に溶解した. この溶液を 0.1 ml を取り, 水を 4.9 ml を加えてよく混和した. 水を対照として, この溶液の吸光度 (262 nm) を測定し, 分子吸光係数 $\epsilon_{262\text{ nm}} = 3300$ より正確な濃度 (μM) を求めた. これをニコチンアミド標準溶液とした.

⑤ 2-Py 標準

2-Py (分子量 167.12. 和光純薬工業株式会社, 大阪) を 2.0 mg 秤量し, 水 2 ml に溶解した. この溶液を 0.1 ml を取り, 水を 9.9 ml を加えてよく混和した. 水を対照として, この溶液の吸光度 (262 nm) を測定し, 分子吸光係数 $\epsilon_{260\text{ nm}} = 14516$ より正確な濃度 (μM) を求めた. これを 2-Py 標準溶液とした.

(3) サンプルの使用法

図 4 に示した方法に従い, 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 システムに注入した. イソニコチンアミド, ニコチンアミド標準溶液及び, 2-Py 標準溶液は, そのまま各 20 μl を HPLC

に注入した. 濃度の高い試料については, 用いた尿を 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とした.

(4) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い, 定量は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 量を以下の式により算出した.

① 回収率を計算した.

回収率 (%) = 試料のイソニコチンアミド検出 AREA / イソニコチンアミド標準 (20 $\mu\text{l/ml}$) の 20 μl 検出 AREA \times 100

② 各標準溶液を HPLC に流し, 1 nmol あたりの面積を計算した.

③ 尿を HPLC に流し, 面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた.

(検出 AREA / おのおのの 1 nmol 当たりの AREA) \times (500 μl / 20 μl) \times (1 日の尿量 (ml) / 1 ml) \times (100 / 回収率 (%))

MNA

(1) 試薬類の調製方法

① 1 M KH_2PO_4 (pH 3.0)

136.09 g の KH_2PO_4 を秤量し, 水を 800 ml 加え, 完全に溶解した. この液にリン酸を滴下し, pH メーターを使い, pH を 3.0 に調整した. そして, 水で 1000 ml にした.

② 100 mM EDTA-2Na

EDTA-2Na を 0.372 g 秤量し, 10 ml の水に溶かした.

③ 6M NaOH

NaOH を 120 g 秤量し, 250 ml 程度の水で溶かした. (このとき, 刺激臭と熱を発するのでドラフト内で氷で冷やしながら行な

った.) メスシリンダーにて水で 500 ml にした。

④ 100 mM アセトフェノン in エタノール
アセトフェノンを 2.4 g 秤量し、エタノールにて 200 ml にした。

⑤ 1M Isonicotinamide

イソニコチンアミドを 1.22 g 秤量し、水にて 10 ml にした。

⑥ HPLC 用の移動相

超純水 969 ml に、1 M KH_2PO_4 (pH 3.0) 30 ml と、100 mM EDTA-2Na 1 ml と、1-Heptane-sulfonic acid sodium salt 1 g と、アセトニトリルを 290 ml を加えてよく混和した。

(2) 標準溶液の調製

① MNA 標準

MNA (分子量 172.61. 東京化成工業株式会社、東京) は MNA-Cl を 0.002 g 秤量し、水を 2 ml 加えて溶解した。

② ①の溶液を 0.1 ml を取り、水を 4.9 ml を加えてよく混和した。水を対照として、この溶液の吸光度 (265 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{264.6 \text{ nm}} = 4940$ より正確な濃度 (μM) を求めた。これを MNA 標準溶液とした。

(3) サンプルの使用法

図 5 に示した方法に従い、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 μm フィルターで濾過し、20 μl を HPLC システムに注入した。MNA 標準溶液は、そのまま各

20 μl を HPLC に注入した。濃度の高い試料については、用いた尿を 0.1 M 塩酸にて希釈を行い測定試料とした。

(4) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い、定量は MNA 量を以下の式により算出した。

① 20 μl と 40 μl の標準より、1 pmol 当たりの AREA を計算し、平均を取る。

1) 20 μl の標準：標準の濃度 (mol / l) \times 20 $\times 10^{-6}$ (L) = a (pmol)

この液が 3 ml 中に含まれるので、HPLC に注入した 20 μl 中には

$a \times (20 / 3000) = \underline{A}$ が含まれていることになる。

2) 40 μl の標準：標準の濃度 (mol / l) \times 40 $\times 10^{-6}$ (L) = b (pmol)

この液が 3 ml 中に含まれるので、HPLC に注入した 20 μl 中には

$b \times (20 / 3000) = \underline{B}$ が含まれていることになる。

② 検出 AREA / 1 pmol 当たりの AREA \times 3000^{*1} / 20^{*2} \times 1 日の尿量 (ml) / 0.1^{*3} $\times 10^{-3}$ = _____ nmol / day

*1 : 全量

*2 : インジェクションした量

*3 : 使用した尿量

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¹²⁾。詳細は II-1. に記載した。

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^{13,14)}。詳細はII-1.に記載した。

ビオチン

800×g, 5分間遠心分離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^{15,16)}。詳細はII-2.に記載した。

ビタミンC

尿中アスコルビン酸 (AsA), デヒドロアスコルビン酸, 2,3-ジケトグルン酸の総量を測定しその総量を尿中アスコルビン酸量とした。測定方法は, Kishida らの方法¹⁷⁾による, UV 検出器を装備した HPLC にて行った。HPLC システムの分析条件については, 表 8 に示した。

(1) 試薬類の調製方法

① 5%メタリン酸溶液

メタリン酸を 135.14 g 秤量し, 水を加えて溶解した後, 全量を 1000 ml とした。

② 1%塩化すず / 5%メタリン酸溶液

塩化すずを 0.1 g 秤量し, 10 ml の 5%メタリン酸溶液にて溶解した。用時調製とした。また, 使用するまで氷冷した。

③ 0.2% Indophenol 溶液

2,6-Dichlorophenol-indophenol sodium salt dihydrate を 0.1 g 秤量し, 水を加えて溶解した後, 全量を 50 ml とした。調製後は遮光した上で冷蔵保存し, 1 週間以内に使用し

た。

④ 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン / 4.5 M 硫酸溶液

18 M 硫酸 44 ml と水 56 ml を混合し, 4.5 M 硫酸を調製した。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを 2 g 秤量し, 調製した 4.5 M 硫酸 100 ml に加えて溶解した。調製後は遮光して室温に保存し, 1 か月以内に使用した。

⑤ 10%トリエチルアミン溶液 (pH 3.0)

トリエチルアミンを 10 g 秤量し, 約 80 ml の水を加えて溶解した。これに, リン酸を少量ずつ添加して pH を 3.0 に調整した後, 水を加えて全量を 100 ml とした。調製後は冷蔵保存した。

⑥ HPLC 用の移動相

10%トリエチルアミン溶液を 6 ml に, 水を加えて全量を 600 ml とし, 0.1%トリエチルアミン溶液を調製した。アセトニトリル 500 ml に, 0.1%トリエチルアミン溶液を加えて全量を 1000 ml とした。

(2) AsA 標準溶液の調製

AsA (分子量 176.13. 和光純薬工業株式会社, 東京) を 8.8 mg 秤量し, 5%メタリン酸溶液 10 ml に溶解した。この AsA 標準溶液を 50 μ l 取り, 5%メタリン酸溶液 4.95 ml を加えて混合した。5%メタリン酸溶液を対照として, この溶液の吸光度 (243 nm) を測定し, 分子吸光係数 $\epsilon_{243 \text{ nm}} = 10000$ より正確な濃度 (μ M) を求めた。これを検量線用 AsA 標準溶液①とした。

検量線用 AsA 標準溶液① 0.5 ml に 5%メタリン酸溶液 0.5 ml を加え混合した。これを検量線用標準溶液②とした。

検量線用 AsA 標準溶液② 0.4 ml に 5%メタ

りん酸溶液 0.6 ml を加え混合した。これを検量線用標準溶液③とした。

検量線用 AsA 標準溶液③ 0.5 ml に 5% メタりん酸溶液 0.5 ml を加え混合した。これを検量線用標準溶液④とした。

検量線用 AsA 標準溶液④ 0.5 ml に 5% メタりん酸溶液 0.5 ml を加え混合した。これを検量線用標準溶液⑤とした。

(3) サンプルの使用法

(2) で調製した検量線用 AsA 標準溶液①~⑤、測定試料の各 200 μ l について、以下の処理を行い、最終試料の 20 μ l を HPLC システムに注入した。

- ① 0.2% Indophenol 溶液 100 μ l を加えて混和した。
- ② 1% 塩化ナトリウム / 5% メタりん酸溶液 50 μ l を加えて混和した。
- ③ 2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン / 4.5 M 硫酸溶液 120 μ l を加えて混和した。
- ④ 50°C に設定したインキュベーターにて 1.5 時間加温した。
- ⑤ 水 1 ml を加えて混和した。
- ⑥ 酢酸エチル 1 ml を加えた。
- ⑦ 振とう機にて、5 分間振とうした。
- ⑧ 780 \times g で 1 分間遠心した。
- ⑨ 酢酸エチル層 600 μ l を別の容器に分取した。
- ⑩ 遠心エバポレータで乾固させた (35°C, 30 分間)。
- ⑪ アセトニトリル 200 μ l を添加し、タッチミキサーで攪拌して、乾固物を溶解した。
- ⑫ ミクロフィルター (Millex-HV, 0.45 μ m, 日本ミリポア株式会社, 東京) にてろ過し、最終試料とした。

(注意事項)

遠心エバポレータは、使用 1 時間前に冷却トラップを作動させておいた。

濃度の高い試料については、5% メタりん酸溶液にて希釈を行い測定試料とした。

(5) 計算方法

ピークの同定は保持時間により行い、定量は AsA のピーク面積による絶対検量線法によって行った。すなわち、検量線用 AsA 標準溶液①~⑤及び測定試料の測定より得られた AsA のピーク面積をパーソナルコンピュータ (表計算ソフトウェア: Microsoft Excel) に入力し、以下の式に基づき尿中の AsA 濃度を求めた。

① 検量線用 AsA 標準溶液①~⑤を HPLC に流し、1 pmol あたりの面積を計算した。

② 測定試料 (尿) を HPLC に流し、面積より以下の計算式に基づき濃度を求めた。

$$\begin{aligned} & \text{尿中 AsA 濃度 } (\mu\text{mol} / \text{day}) \\ &= \text{測定試料の面積} / (1 \text{ pmol あたりの AsA} \\ & \text{標準面積}) \times (1000 \mu\text{l} / 600 \mu\text{l}) \times \{200 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l} \\ & (\text{HPLC 試料注入量})\} \times (1 \text{ 日の尿量 ml} / \\ & 0.05 \text{ ml}) \times (1 / 10^6)^{*1} \times \text{希釈倍率} \end{aligned}$$

*1: 単位を pmol から μ mol にするため

4. 統計処理

数値はすべて平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。有意差検定には GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, alifornia, 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. 結果と考察

尿中に排泄された水溶性ビタミンの分布を施設ごとに図6～図9に示した

チアミンの排泄量を施設ごとに比較してみると、施設-4のみが他の施設に対して、有意に低い値を示した。そのため、適正排泄量以下のヒトが50%もいた。

リボフラビンの排泄量を施設ごとに比較してみたが、施設による差異は認められなかった。適正排泄量以下のヒトが40%程度みられた。

ビタミンB₆の異化代謝産物である4-PICの排泄量を施設ごとに比較したが、施設による差異は認められなかった。適正排泄量以下のヒトが30%程度みられた。

ビタミンB₁₂の排泄量を施設ごとに比較してみると、施設-4のみが有意に高い値を示した。ビタミンB₁₂は主要な排泄経路が尿ではないため、栄養状態の指標としては使用できない。なお、排泄される量は摂取量の2～3%である。

パントテン酸の排泄量を施設ごとに比較したが、施設による差異は認められなかった。適正排泄量以下のヒトが15%程度みられた。

葉酸の排泄量を施設ごとに比較してみると、施設-1のみが有意に高い値を示した。施設-1では、適正排泄量以下のヒトが3%にすぎなかったが、施設-2、-3、-4では50%程度が適正排泄量以下であった。

ビオチンの排泄量を施設ごとに比較してみると、施設-1のみが有意に高い値を示した。施設-1では、適正排泄量以下のヒトが3%にすぎなかったが、施設-2、-3、

-4では30%程度が適正排泄量以下であった。

アスコルビン酸の排泄量を施設ごとに比較してみると、施設-4のみが他の施設に対して、有意に高い値を示した。適正排泄量以下のヒトの割合は施設-4が他の施設に比して若干低く、40%程度であったが、他の施設では50%を越えていた。

ニコチンアミドの異化代謝産物であるMNA、2-Py及び4-Pyの合計排泄量は、施設による差異は認められなかった。適正排泄量以下のヒトの割合は25%程度であった。

図10～13に、各水溶性ビタミン排泄量と尿量との関係を示した。ビタミンB₁₂と尿量との関係において、非常に高い相関関係が認められた。このことに関する記述は、本報告書の「II-3」にもある。

以上、女子学生の尿中の水溶性ビタミン排泄量を測定したが、食事摂取基準に従った食事を摂取させた時の値などから求めた適正值と比較して、低値を示したヒトがどのビタミンにおいても認められた。国民健康・栄養調査などによれば、水溶性ビタミンの摂取量は、ほぼ必要量を満たしている。しかしながら、栄養状態を評価するには、摂取量という食品側の情報のみでは不十分である。分析化学や生命科学の進展により、ビタミンの代謝が明らかとなり、健康人においては、尿中に排泄されるビタミン量が栄養指標として利用可能なことのデータが蓄積しはじめている。今回、はじめて、多くの女子学生の1日尿中に排泄される水溶性ビタミン量を測定したが、我々が提唱した適正尿中排泄量以下のヒトが葉酸（施設

-1 を除く), アスコルビン酸においては50%以上のヒトでみられた。水溶性ビタミンの代謝は早いので, 採尿前の数日間の摂取量が反映される¹⁸⁾。すなわち, 水溶性ビタミンは毎日適正量を摂取し続けることが, 健康を維持するために肝要であることを意味している。

尿中の値が適正量以下になったら, すぐに不足しているということではないが, このような食事状態が1週間も続けば, 肝臓中に備蓄されている量が枯渇し, 血液中の値が低下しはじめ, 各種組織・臓器中の値も低下し, やがて欠乏症が顕在化してくる。血液中の値が低下する前の状態をとらえ, すなわち尿中の値をもって栄養状態を評価することが健康を維持する上で大切なことであると考え。このことが, 生活習慣病の一次予防につながるものと信じる。

D. 健康危険情報

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. 日本人の栄養所要量, 昭和44年8月, 厚生省, 大蔵省印刷局, 東京

2. 第六次改定 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—, 平成11年6月, 厚生省保健医療局地域保健・健康増進栄養課生活習慣病対策室

3. 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, 平成16年10月, 厚生労働省保健局総務課生活習慣病対策室

4. 主任研究者 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, 平成16年4月

5. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y (1982)

Liquid chromatographic determination of total thiamin content of blood. *Clin Chem* 28, 29-31

6. 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

7. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1983) New metabolites of rivoflavin appear in human urine. *J Biol Chem* 258, 5623-5628

8. Gregory JF 3rd, Kirk JR. (1979)

Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 32, 879-883