

はペントバルビタール麻酔下で開腹し、ヘパリンを抗凝固剤として下大静脈より採血し、肝臓と脾臓を摘出した。臓器は0.9%生理食塩水で洗浄後、湿重量を測定し、直ちに凍結して分析時まで $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。また、骨髓細胞の採取のため両足の大腿骨を摘出し、直ちに骨髓をHBSSでチューブの中に押し出し、ピペットで懸濁した後1,500 rpmで5分間遠心し、上清を除去して骨髓細胞を得た。骨髓細胞はさらにHBSSを1.5 mL加えて懸濁してから別のチューブに移して8,000 rpmで30秒間遠心し、上清を除去後、HBSSを300  $\mu\text{L}$ 加えて懸濁して測定用試料とした。なお、葉酸測定用の骨髓試料は凍結保存中の葉酸の分解を防止するため1%アスコルビン酸ナトリウムで5倍に希釈してから $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 1-2 被検者における実験

ヒトにおける葉酸の染色体損傷に対する影響は、短期の葉酸投与を行い、血液中の葉酸およびホモシステイン濃度の変化を踏まえて検討した。被験者は20代健常男性22名(平均年齢23歳)を対象とし、10名を対照群、12名を葉酸投与群とした。なお、研究は倫理委員会の承認、ならびに被験者の同意を得て行った。葉酸の投与量は、第5次改定日本人の食事摂取基準の許容上限摂取量を超えないように800  $\mu\text{g}/\text{日}$ に設定し、2週間投与した。被験者の食事記録と葉酸摂取の確認を行い、試験開始・終了時の空腹時に静脈血を採取し、各種分析用の試料とした。

#### 2. X線全身照射後の体内葉酸濃度の変化

#### についての検討

日本クレア(東京)から購入した4週齢ICR系雄マウスを個別にプラスチック製のケージに入れ、室温( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ )、12時間の明暗サイクル(明期:7:00~19:00)の動物室内で飼育した。マウスの全身にX線を照射し、X線照射(3 Gy)からの経過時間(0, 1, 3, 5, 24, 48, 96, 120時間後に屠殺)、および照射線量(0, 1, 3, 10 Gyを照射し、24時間後に屠殺)について検討した。実験1と同様の方法で分析した。

#### 3. 分析方法

##### 3-1 葉酸濃度の測定

血漿は0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で適宜希釈した。全血はポリグルタミン酸鎖を切断するため $37^{\circ}\text{C}$ 、30分インキュベートし、その後0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で適宜希釈した。肝臓には9倍量、骨髓細胞には4倍量の50 mMリン酸緩衝液(pH6.1, 0.5%アスコルビン酸)を加えてホモジナイズした後、オートクレーブで $121^{\circ}\text{C}$ 、30分間加熱し、葉酸を抽出し、すぐに氷冷し、2500 g、15分間、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心した。その上清150  $\mu\text{L}$ にラット血清由来のコンジュガーゼ100  $\mu\text{L}$ 、50 mMリン酸緩衝液(pH6.1, 0.5%アスコルビン酸)2.79 mLを加えて遮光下で $37^{\circ}\text{C}$ 、6時間インキュベートし、葉酸測定試料とした。なお、ラット血清由来のコンジュガーゼは、活性炭処理して混在する葉酸を除去して利用した。葉酸は*Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 27773)を利用した微生物学的方法により定量した。

##### 3-2 血漿ホモシステイン濃度

血漿 60  $\mu\text{L}$  に PBS (pH7.3) 30  $\mu\text{L}$  と 10%Tris-(2-carboxylethyl)-phosphine 10  $\mu\text{L}$  を加えて 37°Cにて 15 分間インキュベートした。10%Trichloroacetic acid (1mM EDTA) 90  $\mu\text{L}$  添加し、すぐに 7000  $\times g$  で 10 min 間遠心し、得られた上清 40  $\mu\text{L}$  に 0.125 M ホウ酸緩衝液 (pH9.5, 4 mM EDTA) 125  $\mu\text{L}$ , 1.55 M 水酸化ナトリウム 10  $\mu\text{L}$ , 1 mg/mL 7-Fluorobenzo-2-Oxa-1,3- Diazole-4-Sulfonic Acid ammonium Salt 150  $\mu\text{L}$  を加え遮光下で 60°Cにて 60 分インキュベートし、冷却した液を HPLC 用試料とした。HPLC は蛍光検出器を装着し、カラム Capcell Pack UG120 (3  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  4.6 mm), 移動相に 0.1 M リン酸二水素カリウム (4%メタノール, pH2.7), 流速 1.0 mL/分, 励起波長 385 nm, 発光波長 515 nm, 試料注入量 20  $\mu\text{L}$  とした。

### 3-3 ビタミン C 濃度

血漿はその 10  $\mu\text{L}$  に 5%メタリン酸 100  $\mu\text{L}$  を加え、4°Cにて 9000 rpm, 10 分間遠心し、それらの上清を HPLC 試料とした。肝臓は 5 倍量の水を加えホモジナイズし、その 5  $\mu\text{L}$  に 6%メタリン酸 995  $\mu\text{L}$  を加え、血漿と同様の処理を施し HPLC 試料とした。これらの試料中のビタミン C を電気化学検出器を装着した HPLC により分析した。

### 3-4 ビタミン E 濃度の測定

血漿, 肝臓, または骨髄のホモジェネート (約 10~50  $\mu\text{L}$ ) に 0.15%BHT エタノール 1 mL を加えてよく混和し、さらに水 1 mL を加えて混和した後ヘキサン 5 mL によりビタミン E を抽出した。ヘキサン層を分取して濃縮乾固し、メタノールに適宜溶解し、HPLC 試料とした。試料中のビタミン E は

電気化学検出器を装着した HPLC により分析した。

### 3-5 染色体損傷度の測定

動物実験では末梢網状赤血球を利用した小核試験法により評価した。またヒトリンパ球の染色体損傷は、サイトカラシン B を用いた小核試験法により評価した。

## C. 結果

### 1. 葉酸の染色体損傷抑制作用に関する検討

動物実験では、低葉酸を負荷しても骨髄染色体損傷度の増強は認められなかった (図 1)。一方、X 線照射による骨髄染色体損傷は低葉酸食群で著しく高く、基本食群と高葉酸食群では差異がなかった。血漿葉酸濃度は、低葉酸食群, 基本食群, 高葉酸食群の順に高くなった (表 3)。一方、組織中の濃度として測定した、骨髄, 赤血球, 肝臓の葉酸濃度は、低葉酸群では低く、基本食群と高葉酸食群で差異がなかった。体内葉酸レベルを示す生体指標の 1 つである血漿ホモシステイン濃度も基本食群と高葉酸食群の間に差はなかった。これらの結果は、X 線照射による骨髄染色体損傷度の変動の結果とよく対応していた。

被検者実験では、血漿葉酸濃度は葉酸投与群において増加したが、血漿ホモシステイン濃度は葉酸投与による影響を受けなかった (表 4)。X 線照射を行わない条件でのリンパ球染色体損傷は葉酸投与により低下する傾向は認められたが有意な変化ではなかった (表 5)。X 線を照射したとき、リンパ球染色体損傷は著しく増加したが、葉酸

投与の影響は全く認められなかった。

## 2. 酸化ストレス負荷 (X 線照射) に伴う体内葉酸濃度の変動

X 線照射後の時間経過との関連では、血漿において葉酸は照射 1 時間後から減少し、24 時間後に 53% と最小になったが、ビタミン C とビタミン E に変化はなかった (図 2)。骨髄において、ビタミン C は 1 時間後から減少し、24 時間後に検出できないレベルになった (図 3)。葉酸とビタミン E は 1 時間後から減少し、48 時間にそれぞれ 26% と 12% と最小値を示した。照射線量との関連では、血漿において葉酸は 1 Gy で減少し、3 Gy で最小となった (図 4)。ビタミン C とビタミン E は照射線量による変動は見られなかった。骨髄ではビタミン C は 1 Gy で検出できないレベルにまで減少し、葉酸とビタミン E は 1 Gy で減少し 3 Gy で最小となった (図 5)。*in vitro* でマウスの血漿に X 線を照射したところ、葉酸は有意に減少したが、ビタミン C とビタミン E の濃度に変化は見られなかった (図 6)。

## D. 考察

低葉酸の条件において、染色体損傷が惹起されるか検討したところ、低葉酸そのものによって骨髄染色体損傷は増強されなかった。しかし、X 線を全身照射して染色体損傷を誘発した条件では、低葉酸により骨髄染色体損傷は増強された。ただし、高葉酸食群と基本食群では染色体損傷度に差はなかった。同様の現象は、低葉酸マウスにヒ素やカフェインを投与して染色体損傷を

惹起した実験でも報告されている。これらの結果から、低葉酸の状態は種々の物質からの染色体損傷を受けやすくなっていること、すなわち葉酸は染色体の安定性に関与していることを示唆した。一方、基本食の 20 倍の葉酸を含む高葉酸食を与えても、体内葉酸レベルは基本食群とほとんど差異が無く飽和してしまうこと、またそのような状態では葉酸の染色体損傷抑制作用は発現しないことが示唆された。体内葉酸濃度が飽和している状態は、体内葉酸レベルを示す生体指標の 1 つである血漿ホモシステイン濃度が増加しなかったことでも示唆された。既に十分な葉酸を摂取しているヒトを対象とした実験においても、葉酸投与は *in vitro* での X 線照射によるリンパ球染色体損傷度の抑制を示さなかった。以上の結果は体内葉酸が飽和する以上の量の葉酸を摂取しても意味がないこと、すなわち葉酸の必要量には上限があることを示唆した。

生体に酸化ストレスが負荷された状態で体内葉酸濃度の変動を検討した実験において、葉酸は血漿でも骨髄でも有意に低下した。低下の割合は組織により若干異なるが、この結果は生体に酸化ストレスが負荷された状態で葉酸が分解されやすいことを示唆した。葉酸は、がんの化学療法の効果と毒性に影響を与えることが報告されている。この研究結果より、放射線治療による葉酸レベルの低下は治療の結果に影響を与える可能性が示唆される。すなわち放射線治療、酸化ストレスが関連する種々の疾病の状態においても葉酸の摂取量を考慮する必要があるものと考えられる。

## E. 結論

食事葉酸は種々の刺激に対する染色体損傷の抑制作用を有しているが、体内葉酸濃度が飽和する以上の量を摂取してもさらなる抑制効果はなく、その必要量には上限があると考えられた。また、葉酸は非常に不安定であり、生体に酸化ストレスが負荷された条件ではその必要量は増加すると考えられる。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 発表論文

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.

Endoh K., Murakami M., and Umegaki K., Vulnerability of folate in serum and bone marrow to total body irradiation in mice, *Int. J.Radiat.Biol.*, 2007, 83, 65-71.

### 2. 学会発表

X線照射マウスの骨髄染色体損傷に対する葉酸の防御作用：遠藤香，村上昌弘，木村典代，山岸あづみ，山田和彦，梅垣敬三，平成16年第51回日本栄養改善学会学術総会，金沢，2004年10月

骨髄染色体損傷に対する葉酸の防御作用～X線照射マウスにおける検討～：遠藤香，村上昌弘，杉山朋美，山岸あづみ，木村典

代，山田和彦，梅垣敬三，平成17年第59回日本栄養・食糧学会大会，東京，2005年5月

X線全身照射マウスの体内葉酸濃度と酸化ビタミンの変動に関する検討：遠藤香，村上昌弘，梅垣敬三，平成18年第58回日ビタミン大会，東京，2006年5月

H. 知的財産件の出願・特許状況(予定を含む) なし

表 1 AIN-93G 組成を基本に調製した低葉酸食，基本食，高葉酸食の組成

	g/kg 飼料		
	低葉酸食	基本食	高葉酸食
コーンスターチ	397.486	397.49	397.486
ビタミンフリーカゼイン(蛋白 85%以上)	200	200	200
糊化コーンスターチ(90~94% 六炭糖)	132	132	132
ショ糖	100	100	100
大豆油 (無添加物)	70	70	70
繊維(ソルカーブロック)	50	50	50
ミネラルミックス (AIN-93G-MIX)	35	35	35
葉酸を除いた AIN93G のビタミンミックス (AIN-93-VX)	10	10	10
L-シスチン	3	3	3
重酒石酸コリン (41.1%コリン)	2.5	2.5	2.5
第三ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014
葉酸	0	0.002	0.04

表 2. 種々の葉酸含量飼料 4 週間摂取後, X 線を照射したマウスの体重, 相対肝臓および脾臓重量

Dietary folate	X-ray (Gy)	Body weight (g)	Liver weight (g/100g BW)	Spleen weight (g/100g BW)
Low	0	37.5 ± 3.9	4.01 ± 0.27	0.29 ± 0.18
	0.5	35.2 ± 3.1	4.14 ± 0.17	0.21 ± 0.04 <sup>x</sup>
Basal	0	35.4 ± 2.4	3.95 ± 0.20	0.27 ± 0.02
	0.5	37.5 ± 2.0	4.01 ± 0.12	0.19 ± 0.01 <sup>x</sup>
High	0	36.4 ± 1.1	3.88 ± 0.28	0.25 ± 0.05
	0.5	37.8 ± 0.9	4.03 ± 0.32	0.21 ± 0.04 <sup>x</sup>

Significant effects as determined by two-way ANOVA:

Dietary folate	NS	NS	NS
X-ray	NS	NS	<0.0001
Folate vs X-ray	NS	NS	NS

Male ICR mice (4 weeks old) were fed a low folic acid diet (0 mg/kg), basal diet (2 mg/kg) or high folic acid diet (40 mg/kg) for 4 weeks, then given TBI (0.5 Gy) and sacrificed on day 2 post-exposure. Values are the means ± SD, n=6.<sup>x</sup>, significant TBI effect (versus respective non-irradiated diet group,  $p < 0.05$ )

表 3. 種々の葉酸含量飼料 4 週間摂取後, X 線を照射したマウスの血漿, 赤血球乾燥の葉酸濃度

Dietary effect	X-ray (Gy)	Plasma Folate (nM)	Erythrocyte Folate ( $\mu$ M)	Liver Folate (pmol/mg protein)
Low	0	78.2 $\pm$ 45.7 <sup>d</sup>	1.06 $\pm$ 0.35 <sup>d</sup>	99.1 $\pm$ 25.9 <sup>d</sup>
	0.5	42.6 $\pm$ 10.1 <sup>d</sup>	0.91 $\pm$ 0.45 <sup>d</sup>	125.2 $\pm$ 23.1 <sup>d</sup>
Basal	0	136.3 $\pm$ 26.8	2.38 $\pm$ 0.62	149.8 $\pm$ 24.8
	0.5	99.3 $\pm$ 23.8	2.14 $\pm$ 0.57	161.0 $\pm$ 19.8
High	0	214.2 $\pm$ 64.4 <sup>d</sup>	3.26 $\pm$ 0.49 <sup>d</sup>	172.0 $\pm$ 40.5
	0.5	141.1 $\pm$ 46.4 <sup>x</sup>	2.48 $\pm$ 0.68 <sup>x</sup>	164.8 $\pm$ 36.2
Significant effects as determined by two-way ANOVA :				
Dietary effect		<0.0001	<0.0001	0.0001
TBI effect		0.002	0.0389	NS
Diet vs TBI		NS	NS	NS

Male ICR mice (4 weeks old) were fed a low folic acid diet (0 mg/kg), basal diet (2 mg/kg) or high folic acid diet (40 mg/kg) for 4 weeks, then given TBI (0.5 Gy) and sacrificed on day 2 post-exposure. Values are the means  $\pm$  SD, n=6. <sup>d</sup>Significant dietary effect (versus basal folic acid diet group with same TBI dose ;  $p < 0.05$ ). <sup>x</sup>Significant TBI effect (versus unirradiated (0 Gy) group with the same diet treatment ;  $p < 0.05$ ).

表 4. 被験者に 2 週間葉酸を摂取させる前後の血漿葉酸およびホモシステイン濃度

	Control	Folic acid
Folate (nM)		
Baseline (pre)	13.6 ± 5.0	10.3 ± 3.2
2 wk (post)	11.5 ± 3.1	29.4 ± 3.7
pre-post	- 2.0 ± 6.7	19.1 ± 2.9*
Homocysteine (μM)		
Baseline (pre)	6.7 ± 4.0	7.4 ± 2.5
2 wk (post)	6.7 ± 3.9	7.0 ± 2.5
pre-post	- 0.1 ± 0.5	- 0.4 ± 1.3

Healthy male volunteers were supplemented with placebo or folic acid 800 μg/day for 2 weeks. Before and after the supplementation period, their peripheral blood was collected after an overnight fast. Values are the means ± SD (n=10 in placebo group, and n= 12 in supplemented group). \*: Significant supplementation effect (versus placebo :  $p < 0.05$ )

表 5. 2 週間の介入試験前後の自然発生および X 線照射により誘発したリンパ球中の染色体損傷

X-ray irradiation	Control		Folic acid	
	—	+	—	+
(% of MNed binucleated cells in binucleated cells)				
Baseline (pre)	2.6 ± 2.1	29.6 ± 6.8	2.1 ± 1.3	36.6 ± 8.8
2-wk (post)	2.7 ± 3.4	33.1 ± 12.8	2.0 ± 0.8	35.0 ± 10.9
pre-post	- 0.1 ± 3.2	3.5 ± 13.7	0.1 ± 0.9	- 1.6 ± 9.9

Healthy male volunteers were supplemented with placebo or folic acid 800 μg/day for 2 weeks. Before and after the supplementation period, their peripheral blood was collected after an overnight fast. Blood samples were irradiated with and without X-ray (0.5 Gy) in vitro, and subjected to chromosomal analysis by micronucleus assay. Values are the means ± SD (n=10 in placebo group, and n=12 in supplemented group).



表 6 . X 線全身照射(3 Gy)後の体重および相対脾臓重量の時間依存変化

Time after x-ray (h)	Body weight (g)	Relative spleen weight (g/100gBW)
0	28.9 ± 1.8	0.32 ± 0.03
1	29.2 ± 1.2	0.39 ± 0.06
3	29.5 ± 1.6	0.28 ± 0.04
5	29.3 ± 2.0	0.28 ± 0.06*
24	28.2 ± 2.2	0.19 ± 0.02*
48	28.7 ± 1.6	0.15 ± 0.03*
96	29.3 ± 2.7	0.17 ± 0.03*
120	29.4 ± 2.6	0.18 ± 0.02*

Male ICR mice (4 weeks old) were subjected to TBI via x-ray at a dose of 3Gy, and then sacrificed at 1, 3, 5, 24, 48, 96, 120h. Values are the means ± SD, n=5.\*Significant TBI effect (versus non-irradiated diet group,  $p<0.05$ )

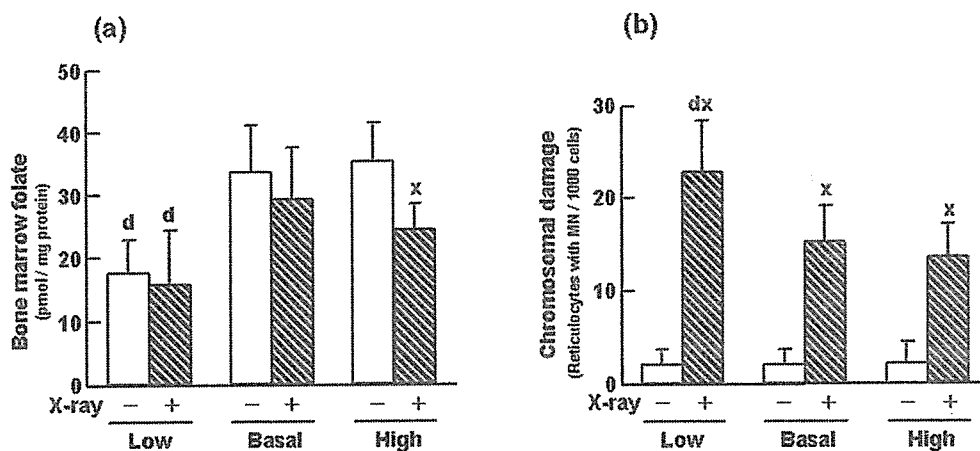


図 1. 種々の葉酸含量の飼料を4週間摂取させたマウスにX線を照射したあとの骨髄中の葉酸濃度と染色体損傷(動物実験)

Male ICR mice (4 weeks old) were fed a low folic acid diet (0 mg/kg), basal diet (2 mg/kg) or high folic acid diet (40 mg/kg) for 4 weeks, then given TBI (0.5 Gy) and sacrificed on day 2 post-exposure. Chromosomal damage in bone marrow was evaluated by the appearance of MNed reticulocytes in peripheral blood, determined 2 days after TBI. <sup>d</sup>, Significant dietary effect (versus basal folic acid diet group with same TBI dose;  $p < 0.05$ ). <sup>x</sup>, Significant TBI effect (versus unirradiated (0 Gy) group with the same diet treatment;  $p < 0.05$ ).

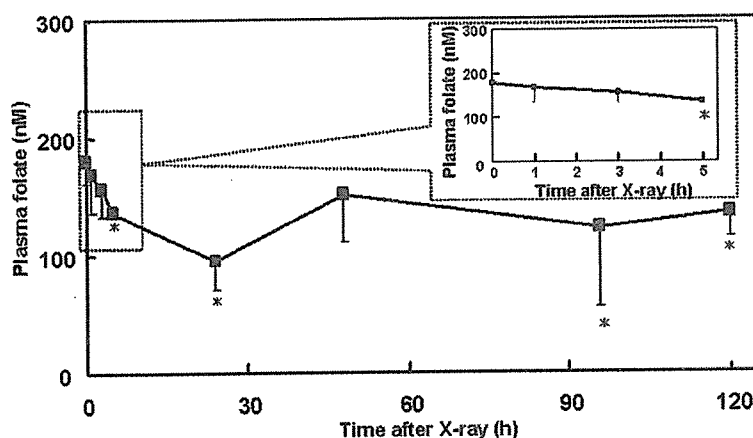


図 2. X線全身照射(3 Gy)後のマウスの血漿葉酸濃度の時間変化

Male ICR mice (4 weeks old) were subjected to TBI via x-rays at a dose of 3 Gy, and then sacrificed at 1, 3, 5, 24, 48, 96, 120 h for the analysis of antioxidant vitamins. Each point and vertical bar indicates the mean and SD for 5 mice. \*Significantly different from nonirradiated level ( $p < 0.05$ ).

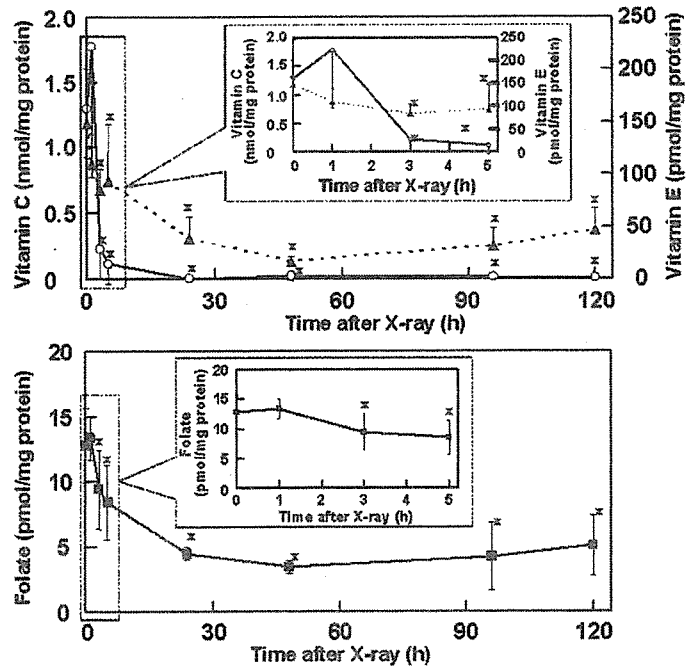


図3. X線全身照射(3 Gy)後のマウスの骨髄中の葉酸, ビタミンCおよびビタミンE濃度の時間変化

Male ICR mice (4 weeks old) were subjected to TBI via x-rays at a dose of 3 Gy, and then sacrificed at 1, 3, 5, 24, 48, 96, 120 h for the analysis of antioxidant vitamins. Each point (vitamin C, circle; vitamin E, triangle; folate, square) and vertical bar indicates the mean and SD for 5 mice. \* Significantly different from nonirradiated level ( $p < 0.05$ ).

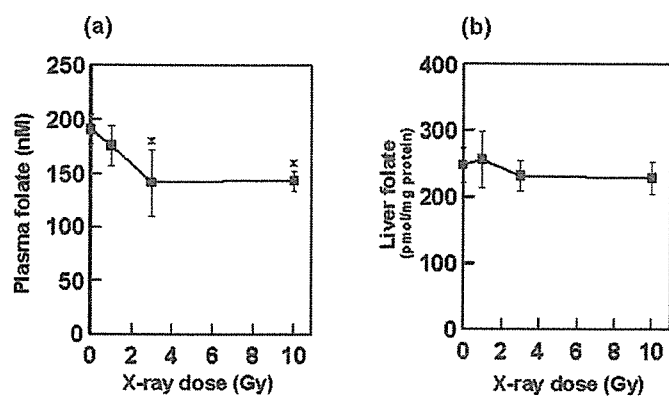


図4. X線全身照射後のマウスの血漿および肝臓濃度の線量依存変化

Male ICR mice (4 weeks old) were subjected to TBI via x-rays at a dose of 0, 1, 3, 10 Gy. The concentrations of vitamins were determined 24 h after irradiation. Each point and vertical bar indicates the mean and SD for 5 mice. \*Significantly different from nonirradiated level ( $p < 0.05$ ).

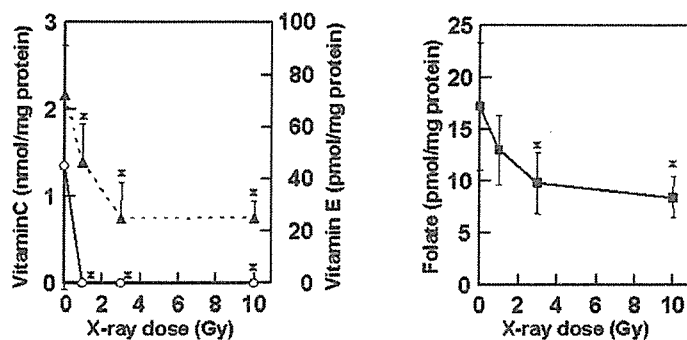


図5. X線全身照射後のマウスの骨髄の葉酸、ビタミンCおよびビタミンE濃度の線量依存変化

Male ICR mice (4 weeks old) were subjected to TBI via x-rays at a dose of 0, 1, 3, 10 Gy. The concentrations of vitamins were determined 24 h after irradiation. Each point (vitamin C, circle; vitamin E, triangle; folate, square) and vertical bar indicates the mean and SD for 5 mice. \*Significantly different from nonirradiated level ( $p < 0.05$ ).

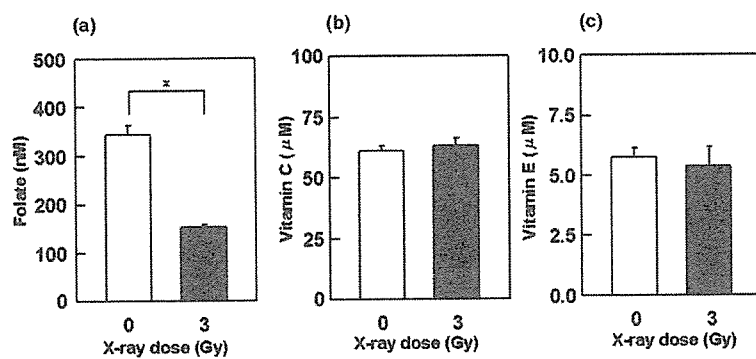


図6. マウス血漿に *in vitro* で X 線照射した場合の葉酸(a), ビタミン C(b)およびビタミン E (c)濃度の変化

Fresh mice plasma was irradiated with x-ray (3 Gy) and changes in the concentrations of folate, vitamin C and E were measured. \*Significant irradiation effect ( $p < 0.05$ ).

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

#### 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

分担協力者	渡邊 敏明	兵庫県立大学	教授
研究協力者	榎原 周平	兵庫県立大学	助手
研究協力者	福井 徹	病体生理研究所	室長

#### 研究要旨

本研究では、健常な女子大学生 15 名を対象にした。まず、タンパク源に魚介類を使用した一般献立の実験食を摂取させ、血中と尿中でのビオチン量の変化について検討した。この結果、血中では、起床直後と昼食摂取後の採血において、ビオチン濃度に変化はみられなかった。一方、尿中ビオチン排泄量は、採尿時間によって排泄量が変動した。これは、尿へのビオチン排泄において食事時のビオチンが影響していることが考えられる。次に、ビオチン負荷食として、鶏卵（ゆで）5 個（約 300 g）、食パン（6 枚切り）1 枚（約 70 g）、バター 60 g および食塩 0.5 g を摂取させ、血中と尿中でのビオチン量の変化について検討した。この結果、血中では、ビオチン負荷食を摂取した 6 時間後に有意に高値を示したが、いずれも基準値内であった。一方、尿中ビオチン排泄量では、ビオチン負荷食を摂取した直後に増加し、摂取 3 時間後にピークとなり、その後は徐々に減少した。以上のことから、一般献立の日常食においては、血清ビオチン量は変化しなかったが、ビオチンの尿排泄に変動がみられた。つまり、食事からビオチンを摂取した場合には、サプリメントとは異なり、ビオチンはゆるやかに吸収され、排泄されることが示唆された。

## A. 目的

水溶性ビタミンの1つであるビオチンの生理機能とし、カルボキシラーゼの補酵素として脂肪酸合成、糖新生およびエネルギー代謝に関与している<sup>1-3)</sup>。ビオチンが欠乏すると、皮膚炎、脱毛、うつ病や幻覚などの神経障害などが引き起こされる。しかし、ビオチンは種々の食品に含まれているため、極端な偏食者や遺伝性疾患の患者を除いて、一般に欠乏症状は起こらないとされている。しかし、最近では、動物実験やヒト試験において妊娠期に多量のビオチンを必要とし、軽度のビオチン欠乏が起こることが報告されている<sup>4-6)</sup>。

ビオチンを多く含む食品としては、レバーや卵黄などがあげられる<sup>7)</sup>。食品中のビオチンの形態は、大部分がタンパク質と共有結合したタンパク結合型で存在しており、体内では、消化管内の消化酵素によりビオチニルペプチドに加水分解され、さらに腭液中のビオチニターゼによって遊離型となる。遊離型ビオチンは、主に空腸から吸収される<sup>8,9)</sup>。しかし、食品中のビオチンがどの程度生体で利用されているかは、不明である。なお、ビオチンは腸内細菌によって一部産生されているという報告があり<sup>10)</sup>、ビオチンの小腸や大腸での吸収についても注目されている。ビオチンの摂取基準については、「第六次改定日本人の栄養所要量」ではじめて策定され、「日本人の食事摂取基準（2005年版）」において、ビオチンの目安量が成人で45 µg/日と定められた<sup>11)</sup>。しかし、策定するための科学的根拠、とくにビオチンの体内動態や生体利用率について

の解析が不十分である。そこで、本研究では、健常な成人女性を対象に、食事からのビオチン摂取と血中濃度および尿中排泄量の関連について、基礎的検討を行った。

## B. 実験方法

### 1. 被験者

健常な日本の女子大学生 15 名を対象とした。身体的特徴(平均値)は、年齢 19.9 ± 0.9 歳、身長 159.2 ± 5.4 cm、体重 51.2 ± 4.3 kg および BMI が 20.2 ± 1.1 であった。なお、本試験を行うにあたり、独立行政法人国立健康・栄養研究所倫理委員会で承認を受け、「ヘルシンキ宣言」(1964 年承認, 1989 年修正)に従って実施した。また、インフォームドコンセントを行い被験者から文書で同意を得た後、医師の間診を受け、参加可能と判断された者のみ被験者とした。

### 2. 試験方法

ビオチンの尿排泄における日内変動の検討(以下実験 I と示す): 実験食としてタンパク源に魚介類を使用した一般献立の食事(実験食)を摂取させ、血清と尿を採取した。食事は一食ごとに陰膳をとり、純水を一定量加えて攪拌後、凍結乾燥させて試料とした。血清については、起床直後と昼食摂取 4 時間後の計 2 回採血を行い、血清を採取した。尿については、試験開始の前日 22 時から採尿を開始し、夜間尿、空腹時尿および食事摂取を区切りとして、一日を計 6 回に分割し、採取した。

ビオチン負荷試験(以下実験 II と示す): ビオチン負荷食として、鶏卵(ゆで) 5 個

(約 300 g), 食パン (6 枚切り) 1 枚 (70 g), バター 60 g および食塩 0.5 g を起床 2 時間 30 分後に摂取させた後, 血清と尿を採取した. ビオチン負荷食は, 加工した食材に純水を加えて, 十分にホモジナイズしたものを試料とした. 血清については, 起床直後, ビオチン負荷食摂取 3 時間後と 6 時間後の計 3 回採血を行い, 血清を採取した. 尿については, 試験開始の前日 22 時から採尿を開始し, 夜間尿と空腹時尿および負荷食摂取後は 1 時間 30 分ごとに計 7 回に分割し, 16 時まで採取した.

なお, 詳しい試験スケジュールについては図 1 に示したとおりである.

### 3. 試料の分析

ヒト試験より得られた試料 (食事・血清・尿) のビオチン含有量は, ビオチン要求株である乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) を用いた微生物学的定量法に従い<sup>12-15)</sup>, サンプルの特徴を考慮して, 血清および尿については寒天プレート法で, 食事については比濁法で測定を行った.

寒天プレート法: 乳酸菌の前培養には M.R.S.Broth 培地を用い, 35~37℃, 1 夜静置培養し, 遠心分離 (3,000 rpm, 4℃, 5 分) し, 滅菌生理食塩水にて懸濁し, 2 回洗浄後, 1 ml 滅菌生理食塩水で懸濁させて接種菌液とした. 培養の培地調製には, ビオチン定量用基礎培地 (日水製薬(株), 東京) 7.7 g を 180 ml 蒸留水で水浴中加温溶解し, 冷却後 2N 塩酸にて pH 6.8 ± 0.1 に調整し, ブロムクレゾールパープル 0.002%, トリトン X

0.1%となるように加えた後, 蒸留水にて全量を 200 ml とし, Agar Noble (Difco) 1.5%, Agar mate 0.1%を均一に懸濁させ, オートクレーブ (121℃, 2 気圧, 5 分間高压蒸気滅菌) 後, 十分に攪拌し, 50℃まで冷却した. この寒天培地溶液に接種菌液 200 μl, さらにアビジンを 5 ng/ml となるように添加し, すばやく混和し, 50 ml を水平板上の滅菌角 1 号シャーレ (栄研器材(株), 東京) に流しこみ, 室温にて固化させた. 培地を乾燥させたのち, 直径 3 mm のウェルを作成した. 各ウェルに標準溶液および試料溶液を 10 μl 接種し, 35~37℃にて 18~48 時間培養した. 標準溶液の発育円直径をノギスにて計測した.

比濁法: 乳酸菌の前培養には M.R.S.Broth 培地を用い, 37℃, 炭酸ガス 5% の条件下で 18~20 時間培養後, 遠心分離 (3000 rpm, 5 分) し, 集菌した. 菌体を滅菌生理食塩水 (株) 大塚製薬工場, 鳴尾) で 3 回洗浄後, 菌濃度を濁度で調整 (OD 610 nm = 0.15 前後) したものを接種菌液とした. 培養のため, ビオチン定量用基礎培地 (日水製薬(株), 東京) を用いて 2 倍濃度の培地を作成した. 培地に対して 0.3% 程度の菌液を添加する. 培養にはマイクロプレートを用い, 各ウェルに培地 100 μl と標準溶液および試料溶液を 100 μl 接種し, 37℃, 炭酸ガス 5% の条件下で 18~21 時間培養した. 標準溶液は, D-ビオチン (純度 97% 以上, 和光純薬工業(株), 東京) 10 mg を精秤し, 70% エタノール (特級, 和光純薬工業(株), 東京) を加えて 100 ml に定量し, 標準原液とした. この標準原液



を95%エタノールで10倍希釈したものを中間標準溶液とし、この溶液を超純粋で希釈したものを標準溶液として培養に用いた。測定には、マイクロプレートリーダー Model 550 (日本バイオラッドラボラトリーズ(株), 東京) を用い、波長 610 nm で測定を行った。

#### 4. 試料の調整

血清および実験Ⅱの負荷食は、血清 100  $\mu$ l に対して 4.5 N 硫酸を 100  $\mu$ l 加えて攪拌し、121°C, 2 気圧, 60 分間酸加水分解を行い、4.5 N 水酸化ナトリウムで中和したものを試料溶液とした。また、尿は、原液のまま試料溶液とした。

実験Ⅰの実験食の総ビオチン量の測定には、乾燥重量を一定量計り、重量の 40 倍量の純水を加え、血清と同様に酸加水分解し、中和後に滅菌水で希釈したものを試料溶液とし、測定を行った。遊離型ビオチン量の測定には、総ビオチン量と同様に重量を計量後、重量の 20 倍量の純水を加えて攪拌し、熱抽出 (60°C, 10 分) を行い、遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) し、上清を希釈したものを試料溶液とし、測定を行った。また、負荷食の遊離型ビオチン量についても、実験食と同様に試料溶液を調製した。

また、食事については、測定した遊離型ビオチン量を用いて、遊離率 (総ビオチン量に対する遊離型ビオチン量の割合) も算出した。

#### 5. 統計学的解析

測定より得られた値は、平均値  $\pm$  標準偏

差で表記した。血清については、ビオチン量 (ng/ml) として算出した。尿については、各採尿時間において蓄尿時間が異なるため測定で得られた濃度 (ng/ml) に尿量 (ml) を乗し、それぞれの蓄尿時間 (分) で除して尿中ビオチン排泄量 (ng/分) で表記した。統計ソフトとして、4Step エクセル統計第 2 版 Statcel 2 (有オームエス出版, 埼玉) を使用した。各群間の差の検定については、分散分析および多重比較検定 (Tukey-Kramer) を用い、有意水準は 5%未満とした。

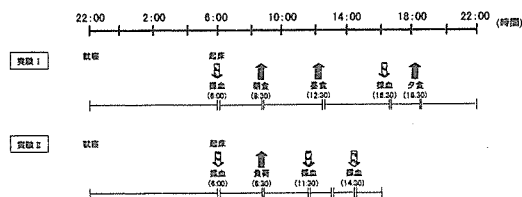


図 1 実験プロトコル

#### C. 結果

実験Ⅰ:ビオチンの尿排泄における日内変動の検討

食事中のビオチン含有量 (平均値) については、図 2 に示したとおりである。食事別にみると、総ビオチン量は、朝食で  $23.6 \pm 2.7 \mu\text{g}$ , 昼食で  $6.7 \pm 1.2 \mu\text{g}$ , 夕食で  $12.4 \pm 0.9 \mu\text{g}$  となり、一日当たりのビオチン摂取量は  $42.6 \pm 4.3 \mu\text{g}$  であった。また、遊離型ビオチン量については、朝食で  $5.4 \pm 1.0 \mu\text{g}$ , 昼食で  $2.7 \pm 0.3 \mu\text{g}$ , 夕食で  $3.7 \pm 0.3 \mu\text{g}$  であり、それぞれの遊離率は、朝食で  $23.3 \pm 6.6\%$ , 昼食で  $40.7 \pm 7.8\%$ , 夕食で  $30.0 \pm 4.1\%$  と算出された。血清総ビオチン量は、起床直後 (1 回目) が  $2.2 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$ , 昼食摂取 4 時間後 (2 回

目)が $2.2 \pm 0.1$  ng/mlと2回の採血において変化はみられなかった。一方、尿中ビオチン排泄量では、採尿時間によって排泄量が変動していた。また、午前中(6時~12時30分)に、一日分の尿中ビオチン量の $43.9 \pm 7.0\%$ が排泄されていた(図3)。

### 実験II: ビオチン負荷試験

ビオチン負荷食のビオチン含有量(平均値)は $41.4 \mu\text{g}$ であり、遊離率は $49.8\%$ であった。血清総ビオチン量は、ビオチン負荷食を摂取6時間後に有意に高値を示したが、いずれも基準値( $1.6\text{-}3.7$  ng/ml)内であった。一方、尿中ビオチン排泄量では、負荷食を摂取直後に増加し、摂取3時間後にピークとなり、その後は徐々に減少した(図4)。

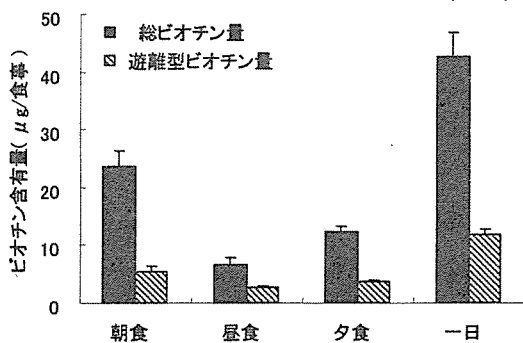


図2 実験食のビオチン含有量(実験I)

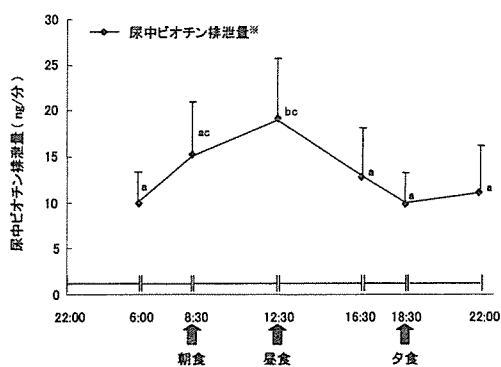


図3 実験食の摂取による尿中ビオチン排泄量の変化(実験I)

Mean  $\pm$  SD ( $\mu\text{g}/\text{min}$ ).

※ $p < 0.01$  (ANOVA one-way layout),

a-c $p < 0.05$  (Tukey-Kramer).

採尿時間.

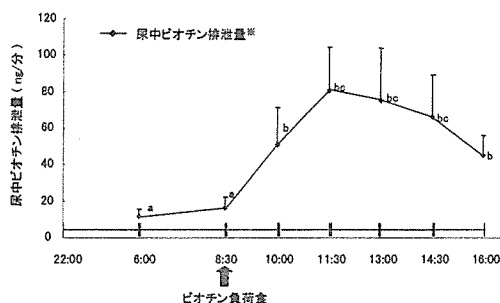


図4 ビオチン負荷食の摂取による尿中ビオチン排泄量の変化(実験II)

Mean  $\pm$  SD ( $\mu\text{g}/\text{min}$ ).

※ $p < 0.01$  (ANOVA one-way layout),

a-c $p < 0.05$  (Tukey-Kramer).

採尿時間.

### D. 考察

本研究の結果から、血中ビオチン濃度は、ホメオスタシスが働いているために、日常的に摂取している一般献立の食事の場合では、影響を受けていないのに対して、尿へのビオチン排泄においては、食事から摂取したビオチンの影響を受け易く、変動していると考えられる。また、尿中への排泄が午前中に多いことが観察されているが、これは生体の生理的機能との関連や栄養学的特性から興味のあることと考えられる。尿中のビオチン濃度は臨床的意義の点では、ビオチン欠乏症の一つの指標であり、ビオチン欠乏の尿では尿中ビオチンの低下と共に、カルボキシラーゼの一つであるメチルクロトニルCoAカルボキシラーゼの低下に

よる 3-ヒドロキシイソ吉草酸の増加が有効とされている。栄養学的特性として、ビオチンの体内代謝について考える必要がある。血漿および尿中でのビオチンとその異化代謝物は、ビオチン、ビスノルビオチンおよびビオチンスルフォキンドが 3 : 2 : 1 の割合で存在していることが報告されている<sup>16-18)</sup>。このように、ビオチンの体内動態を考える場合には、ビオチンのみならず、ビオチン酵素関連物質や異化代謝物についても検討が必要である。

水溶性ビタミンの栄養状態について、尿中に排泄されるビタミンそのものおよびその代謝関連物質の量は良い指標となることが指摘されている<sup>19-21)</sup>。しかし、指標として使用する場合には、一般にバイオリズムを考慮する必要がある。水溶性ビタミンのうち、ビタミン B<sub>1</sub> やビタミン C などの尿中排泄量には明確な日内変動が示されている。このため、栄養状態を一時 (スポット) 尿で判断する場合には、食事時間や食事内容などを考慮する必要がある。しかし、尿中ビタミン B<sub>2</sub>、ビタミン B<sub>12</sub> や葉酸などの尿中排泄量には、日内変動は認められていないので、スポット尿でも栄養状態の判定が可能である。ビオチンの尿中排泄量に日内変動は認められておらず、今回の結果とは一致していないが、今後検討が必要である。

食品中のビタミンは、糖やタンパク質などと結合した結合型で存在している。一方、サプリメントに使用されているビタミンは合成されたもので、遊離型である。このため、ビタミンの生体利用率は、ビタミンの存在状態や化学形態によって異なる。奥田

ら (2002) は、ゆで卵黄 (5 個分) およびサプリメント (ビオチン 10 mg) を用いたビオチン負荷試験で、両者とも摂取後の短時間で尿中へビオチン排泄量が急激に増加する。しかし、ビオチンサプリメント負荷の場合は、尿中ビオチン排泄量がすぐに減少するのに対して、ゆで卵黄のビオチン負荷の場合は、徐々に減少することを報告している<sup>22)</sup>。また、福井ら (1994) は、成人においてサプリメントとしてビオチン 2 mg を服用させると、血清ビオチン量は摂取後徐々に増加し、1 時間後にピークとなることを報告している<sup>15)</sup>。この時の血清中ビオチン量は、通常時と比べて約 3 倍に増加しており、サプリメントでは血中ビオチン量に影響することが報告されている。また、尿中ビオチン排泄量についても血清と同様に、摂取 1 時間後に増加がピークを迎え、その後すぐに減少し、負荷前の排泄量に戻っていることが報告されている。今回のヒト実験では、食品中のビオチンは結合型で存在しているため、消化・吸収に時間がかかり、尿への排泄において、ゆるやかな変化が見られたものと考えられる。

ビオチンの摂取量については、著者らが知る限りでは、これまでに国内外を合わせて 11 編の報告がある<sup>23-33)</sup>。国外においては、Hoppner et al. (1978) は、カナダの一般的な食事の調査をしたところ、計算値で 62 µg/日、測定値で 60 µg/日の値を得ている<sup>23)</sup>。また、Lewis and Buss (1988) は、イギリスで 6,925 世帯を対象にした調査で、1 日あたりのビオチンの平均摂取量は 37.5 µg であり、その内 50% 以上を卵類および乳類から摂取して

いると報告している<sup>24)</sup>。わが国では、著者ら(2004)が行った食事調査では、東北地方の中高齢者では陰膳法で29.8~33.3 µg/日である<sup>25)</sup>。谷口と渡邊(2007)の食品群別計算法では61.1 µgであった<sup>33)</sup>。また、トータルダイエット調査では、東京都において45.1 µgである<sup>27)</sup>。一方、このようにビオチンの摂取量については、食事調査法の違いによって、一定した結果が得られていない。この一つの原因としては、ビオチンの吸収や排泄などの体内利用率が十分に明らかにされていないことによる。今回の結果では、ビオチンの栄養状態の指標として、血清ビオチンよりも尿中ビオチン排泄量を利用することが重要であることが示唆された。

以上の結果より、ヒト試験を行う場合にはスポット尿ではなく、一日の全量(一日尿)を採取することが望ましいと考えられる。また、今回は短期的な試験であったため、試験前の食事内容がビオチンの尿排泄量に影響していることが考えられる。ビオチンの体内動態については、今後、長期的な試験によって検討する必要があると考えられる。

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) 渡邊敏明: ビオチン. 木村修一, 小林修平翻訳監修「最新栄養学 第8版」, 建帛社, 東京, 249-260 (2002)
- 2) 渡邊敏明: ビオチン. 日本ビタミン学会編「ビタミンの事典」, 朝倉書店, 東京, 299-323 (1996)
- 3) Dakshinamurti K, Chauhan J: Biotin. Vitamin Hormon, 45 : 337-384 (1989)
- 4) Mock DM, Stadler DD, Stratton SL, Mock NI: Biotin status assessed longitudinally in pregnant women J Nutr. 127 : 710-716 (1997)
- 5) Mock DM, Quirk JG, Mock NI: Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. Am J Clin Nutr. 75 : 295-299 (2002)
- 6) Mock DM, Mock NI, Stewart CW, LaBorde JB, Hansen DK: Marginal biotin deficiency is teratogenic in ICR mice. J Nutr. 133 : 2519-2525 (2003)
- 7) 谷口歩美, 大串美沙, 武智隆祐, 渡邊敏明: わが国の食品に含まれるビオチン量の分析. 日本栄養・食糧学会誌, 58 : 185-198 (2005)
- 8) 古川勇次, 大杉匡弘, 福井徹, 鈴木洋一,