

型ビオチンの腸内加水分解のメカニズムは十分に特徴づけられていずわずかに生物学的利用能に影響を及ぼす要因が知られているにすぎない。最も多くの食事性ビオチンは肉と穀物の中でタンパクと結合していることは明らかであるが、穀物中ビオチンは生物学的に利用できにくいことが明らかである (Mock,1996) アビジン、これはかなりの量が生卵の卵白に見出されるものであるが、小腸内でビオチンと結合し、ビオチン吸収を妨げることが示されてきた

(Mock,1996) .

ビオチニダーゼはタンパクとの共有結合からのビオチンの解離において重要な役割を果たすと考えられている (Wolf et al.,1984) . ビオチニダーゼ欠損症の人に食事性摂取と見積もられた 50-150 $\mu\text{g/day}$  の範囲内の遊離ビオチンの投与は、ビオチニダーゼ欠損症にみられる症状を防止し、ビオチニダーゼ欠損症がビオチン結合タンパクの消化、あるいは不適当な腎臓再吸収、またはその両方の欠如を通じたビオチン欠乏症との関連の結果であることを示してきた。

#### 4-2 腸管吸収と微生物合成

腸管境界膜ブラシ中に局在するビオチンキャリアーはナトリウムイオン濃度勾配に対抗してビオチンを運搬し、構造的に特異的で温度依存性であり、電気的中性である。すなわち、薬理的濃度においては拡散が支配する (Mock,1996) .

ビオチンは腸内細菌叢によって合成される (Bonjour,1991) .ビオチン吸収の中間輸

送体はラットの小腸基部において最もアクティブであり、結腸基部からのビオチンの大事な吸収が起こっている。そしてそれは、結腸の中での微生物合成されたビオチンがヒト要求量を満たすことに寄与している、という概念を立証させている。ビオチンの結腸点滴後の血中濃度上昇の報告ではビオチンはヒト結腸から吸収されていたことが明らかである (Innisa and Allardyce,1983, Oppel,1948,Sorrell,1971) . しかしながら、Kopinski とその同僚たち (1989) は、腸内細菌叢によって合成されたビオチンは局在せず、またはビオチン吸収に寄与する形では存在しないのかもしれないことを示している。

#### 4-3 運搬

吸収後のビオチンの肝臓や他の臓器への運搬はそれほどよく確立されていない

(Mock,1996) . ビオチニダーゼはたぶんビオチン血漿中の結合タンパクとしての役割として、あるいはビオチンに細胞への取り込みを助けるものとして扱われている

(Chauhan and Dakshinamuruti,1988;Wolf et al.,1985). 他の研究は血清中のビオチンは80%以上が非結合であることを示唆している (Hu et al.,1994; Mock and Malik,1992 Schenker et al.,1993) . ビオチンに対して比較的特異的な腸管輸送と似てきている酸アニオンキャリアーは肝臓細胞による取り込みを介在することは明らかである

(Bowers-Komro and McCormic,1985) . 胎盤へのビオチンの取り込みと胎児への輸送はビオチンに対して特異的であることが証

明され、解明された(Hu et al.,1994; Karl and Fisheer,1992; Schenker et al.,1993)が、胎児はビオチンを濃縮せず、胎盤輸送は通過であることが明らかである。

#### 4-4 代謝と排泄

ビオチンの多数の代謝物の分離と化学的同定は微生物と哺乳類での利用の主な特徴が解明されてきた (MacCormik,1976; MacCormik and Wright,1971) . 約半分のビオチンは排泄前に代謝され、Bisnorbiotin と Biotin sulfoxide になる。ビオチン, bisnorbiotin, Biotin sulfoxide はヒト尿と血漿中に分子量としてほぼ3:2:1の割合で存在する (Mock,1996) . それ以外の少量の2つの代謝物, bisnorbiotin methyl ketone, biotin sulfone は最近になってヒト尿中から同定された (Zempleni et al.,1997) . ビオチンの尿中排泄と血清中濃度, その代謝物は多量のビオチンの静脈または経口投与においてもほぼ同様の形態で増加する (Mock and Heird, 1997; Zempleni et al., 1997) .

### 5. ビオチン欠乏症

#### 5-1 食事性欠乏症

ビオチン欠乏障害を最初に報告したのは Boas(1927)である。多量の生卵白飼料を与えたラットに脱毛を伴った湿疹性の皮膚炎を観察した。その後、多くのげっ歯類や小型の哺乳動物では、卵白飼料を長時間与えると、体重の減少に伴って口周囲に赤色鱗状斑や眼瞼の炎症を生じ、体毛が粗になり脱毛が現れる。特に眼瞼周囲の脱毛(眼鏡状脱毛: spectacle eye), 後肢のけいれん, 異

常姿勢(カンガルー様姿勢)などが特徴的である。これらは卵白に含まれているアビジンが消化管内でビオチンと特異的に結合し、腸管からのビオチン吸収を阻害しているためである。これらの症状はビオチンの飼料への添加や皮下注射により速やかに消失する。

ヒトでの臨床所見は顔面周囲の皮膚炎, 結膜炎, 脱毛, 運動失調, 緊張低下, ケト乳酸アシドーシス, 有機酸尿, けいれん, 皮膚感染, 乳児や幼児の発育遅延である。さらに、慢性的に生卵白を摂取した成人や青少年では毛髪の退色を伴う脱毛, 落屑性の脂漏性湿疹, 紅斑性湿疹, うつ, 嗜眠, 幻覚, 四肢の感覚異常がみられている。

免疫系では細胞性, 体液性の免疫機能において影響が現れ, 先天性ビオチン代謝異常の小児においてカンジダ皮膚炎が観察されている。このような小児では皮内テストで反応が遅く, IgA 欠乏やT細胞の割合が低い。ラットでは抗体産生が低下し, マウスではビオチン依存性カルボキシラーゼの活性の低下, 脾臓B細胞数は減少するが, T細胞の割合は増加する。

#### 5-2 臨床的欠乏症

ヒトにおけるビオチン欠乏症の兆候は長期にわたる生卵白の摂取した健常人 (Baugh et al., 1968) と short-gut 症候群を含む吸収不全患者でのビオチン添加前の総合静脈栄養 (TPN) (Mock et al.,1981) で最終的に証明された。ビオチン欠乏症の臨床的知見は皮膚炎, 結膜炎, 脱毛, 中枢神経系障害を含む (Mock,1996) .

成人において1ヶ月から1年の生卵白の摂取とビオチンを含まないTPNを受けることは薄毛、と頻繁に髪の毛の脱色を伴うことが報告されている。大部分の欠乏症の成人は頻繁に眼、鼻、口のまわりに、赤く、うろこ状の皮疹がある。大部分の成人は抑うつ、無気力、幻覚、末端の知覚異常を含む中枢神経系の症状がある。

ビオチンを含まないTPNで幼児はビオチン欠乏症の症状はTPN開始後3から6ヶ月の摂取で現れ始め、これは成人の場合よりも早期であり、多分成長に関連したビオチン要求の増加によるものであろう

(Mock,1996)。関連した皮疹は口、眼、鼻の周りに最初に現れる。これらの幼児に共通して観察される皮疹と異常に広がった太った顔はビオチン欠乏顔貌とよばれている。皮疹の広がりと同時に、耳と会陰開口部が冒される。結果として生じる皮疹は皮膚カンジダ症（通常、病巣から培養できるCandidaからそのように名づけられている）のそれと現れ方が似ており、亜鉛欠乏小に見られるそれと全くよく似ている。TPNの6から9ヶ月後の幼児において脱毛が特徴である。2名の幼児は脱毛開始の3から6ヶ月以内で眉毛とまつげを含む総ての毛がなくなってしまった(Mock,1996)。ビオチン欠乏症幼児では、特徴的な自閉性に伴っての低血圧、倦怠、発達遅延がビオチンの欠如に起因した中枢神経系疾患の総ての特徴である。自閉的行動は成人での中枢神経機能机上に基づく抑うつに相当するものかもしれない。

### 5-3 遺伝性欠乏症

アセチルCoAカルボキシラーゼとプロピオニルCoAカルボキシラーゼは前者が脂肪酸合成、後者がコレステロール側鎖および奇数鎖脂肪酸の代謝に直接関与するビオチン酵素であるが、ビオチン欠乏により引き起こされたこれらの酵素の活性低下は肝臓、皮膚、血清中の脂肪酸の割合を変化させ、特に奇数鎖脂肪酸の割合を増加させる。

ヒトのビオチン欠乏症は、先天性代謝異常症としてビオチニダーゼ欠損症、カルボキシラーゼ欠損症、栄養性ビオチン欠乏症として大量の生卵を摂取した者、特殊ミルク摂取の乳幼児、長期にわたりビオチン無添加の高カロリー輸液を受けた患者などにみられる。

ビオチニダーゼ欠損症は活性低下によって細胞内ではカルボキシラーゼの分解によるビオチンのリサイクルに障害を起こし、細胞外ではビオシチンあるいはビオチニルペプチドからのビオチンの遊離、細胞内へのビオチン取り込みの低下を起こし、結果的にビオチン欠乏を引き起こす。血清ビオチニダーゼ活性が正常平均値の10%以下を完全欠損、10%~30%を部分欠損としている。

カルボキシラーゼ欠損症は単一あるいは多数のカルボキシラーゼ欠損がある。マルチプルカルボキシラーゼ欠損症は新生児・乳児型と遅発・乳幼児型があり、前者はホロカルボキシラーゼ合成酵素の欠損でビオチン薬理量のビオチン経口投与によってカルボキシラーゼ活性は正常に戻るが、後者は繊維芽細胞のカルボキシラーゼ活性は正

常であり、腸管でのビオチン吸収異常によって起こる。

これらの先天性代謝異常症に対して5~40mg/日のビオチン投与が一般的である。

栄養性ビオチン欠乏症は先天性代謝異常症とは異なり、腸管から吸収されるビオチンの不足によって引き起こされる。そのうち卵白障害の実験(Sydenstricker,1942)では、毎日200gの乾燥卵白を与えたとき、7週以降では体内のビオチン低下に伴って皮膚の発赤、疲労感、筋肉痛、知覚異常、嘔吐などの症状が現れ、血液学的にもヘモグロビン減少、コレステロールの増加などが観察されている。これらの症状はビオチン150 $\mu$ g/日を投与すると3~5日後に消失し、尿中ビオチンも正常にもどっている。

摂取不足によるビオチン欠乏症として、わが国ではアレルギー治療用特殊ミルクやメチルマロン酸血症治療用ミルクの摂取によるビオチン欠乏症、またビオチン無添加の高カロリー輸液によるビオチン欠乏症も報告されている。

#### 5-4 その他のビオチン関連疾患

糖尿病では、インスリン依存性糖尿病でビオチン内服により絶食時血糖の低下が観察され、ビオチン欠乏ラットではインスリン分泌応答が低下し、ビオチン投与によって回復すること、さらにインスリン抵抗性糖尿病ラットへのビオチン投与による筋肉への糖の取り込みの実験においてビオチンはインスリン抵抗性を改善することが示唆されている。

乳幼児の脂漏性湿疹、レイナー病(Leiner's

disease: 落屑性紅皮症)で血中、尿中のビオチンが低下している。これは母乳中ビオチンの不足や腸管からのビオチン吸収障害が考えられている。一般に乳児では母乳からのビオチン供給が妨げられると、容易にビオチンの不足状態になる。突然死の乳幼児の肝臓ビオチン量が先天異常などを原因として死亡した乳幼児と比べ低くなっていることから突然死にビオチンの関与が考えられている。

掌蹠膿疱症性骨関節炎や乾癬、アトピー性皮膚炎がビオチンの大量投与によって改善が見られる例があり、ビオチンの免疫機能やアミノ酸代謝への関与が考えられている。

長期血液透析患者でもビオチン欠乏症状と種々の神経障害がみられ、ビオチン投与により神経症状の改善が報告されている。

抗けいれん剤の長期投与で血中ビオチン濃度の低下と有機酸の増加が認められている。特にプリミドンやカルバマゼピンは腸管でのビオチン吸収を妨げることが判明し、フェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピンはビオチンダーゼとビオチンの結合を阻害し、細胞への取り込みに影響があると考えられている。

#### 6. ビオチン欠乏の催奇形性作用

ビオチン欠乏は数種類の動物で催奇形性作用が報告されているが、哺乳動物ではげっ歯類において、ラットを妊娠前からビオチン欠乏状態にすると、胎仔や出産仔の数や体重の減少、吸収胚、死亡胎仔の増加がある。しかし、形態異常は認められてい

い。マウスでは妊娠中のビオチン欠乏は胎仔の奇形や死亡を著しく増加させる。主な形態異常は口蓋裂、小顎症、短肢症で、骨格は下顎骨、頭骸の低形成や頸椎弓の異常が特徴的である。ハムスターにおいても胎仔発育の抑制や吸収胚、死亡胎仔の増加があり、生存胎仔には妊娠中期から形態異常や骨格異常がみられる。げっ歯類の中での催奇形性の違いは母体から胎仔へのビオチン輸送の違いによって起こるものと思われる。

ビオチン欠乏によって生じた脂質代謝の変化がビオチン欠乏のヒナの発育と骨格に影響を及ぼしている可能性も報告されている。

雄の哺乳動物の生殖器およびその付属機関においても、長期間のビオチン欠乏状態で前立腺や精巣の萎縮、細精管の変性があり、ビオチンは雄性生殖腺の発育、機能維持に必要であり、性ホルモン合成と分泌に関連している。

## 7. 疫学調査

### 7-1 成人

部分欠損を含む先天的なビオチンダーゼ欠損症、ビオチン依存性のカルボキシラーゼ欠損症、特殊ミルクやビオチン無添加の高カロリー輸液によるビオチン欠乏症などはごくまれである。

このうち、先天性代謝異常症としてのビオチンダーゼ欠損症は、わが国ではこれまで完全欠損が1例のみで、部分欠損症の報告は数例に過ぎない。

海外では部分欠損を含む先天性ビオチン

ダーゼ欠損症の頻度は新生児の6万人に一人の割合であり、それも白人に限られている。単独のカルボキシラーゼ欠損症として最多のプロピオニルCoAカルボキシラーゼ欠損症の推定頻度は35万人に一人の割合である。他のカルボキシラーゼ欠損症の発生頻度はさらに低い。

わが国におけるビオチン欠乏症は、日常遭遇する疾患の中でのビオチン欠乏や依存症の可能性が推測されてはいるが、データの蓄積は不十分である。

一方、健常者を対象とした血清、血漿、尿中ビオチン濃度は測定法、報告者によりさまざまである。

### 7-2 乳児

一方で母乳中、健常成人の血清中濃度や尿中濃度も測定されているが、いずれも小規模なものであり、さらに健常小児については困難な点が多く、日本人のビオチン必要量を推定するには至っていない。

## 8. 摂取基準

健常者の食品からのビオチン吸収と血中濃度、尿中排泄との関係、どの程度の食品中濃度でビオチン欠乏を起こすかという情報からビオチンのEARを推定し、栄養所要量を算出するためのデータは現状ではきわめて不十分である。最も重要な課題は通常の食品中のビオチン濃度と生物学的有用性の測定が確立していないためである。

食品中ビオチン濃度は前述したように測定法の課題が残っており、生物学的有用性についてもMockらがHPLCとアビジン結

合法によってビオチンとビオチン代謝物の分別定量を報告したが、研究は緒についたところである。ヒト母乳が唯一ビオチン代謝物を含めて測定されてきた食品であり、初乳および成乳までの過渡的な母乳のビオチン代謝物濃度はビオチン濃度を上回るが、成乳ではビオチンは約 70%となる。この意義付けも明確ではない。また、多くの食品におけるビオチンの存在形態はタンパク結合であり、ビオチン測定のための前処理段階でビオチン自体の分解も問題となる。酸加水分解法では母乳の場合、ビオチンの 12~37%破壊されたと報告されており、食品中のビオチン濃度を真の値よりも低く算出することになる。

測定法の確立と標準化が焦眉の課題である。

#### 8-1 目安量

所要量の指標に関してはビオチンが含まれない輸液を受けている患者、先天性代謝異常、大量の生卵白摂取によるビオチン欠乏症など、限られた症例やビオチンの生物学的利用や体内動態の研究を参考とする以外にない。

ビオチン欠乏の指標として、血清あるいは血漿ビオチン濃度があるが、生卵白摂取者の 50%、明らかなビオチン欠乏症の例でも低下が認められず、必ずしも良い指標とはいえない。

また、ビオチン欠乏によるプロピオニル CoA カルボキシラーゼ活性低下に伴って、血漿脂質の奇数鎖脂肪酸が蓄積され、コレステロールエステル、リン脂質、トリグリセ

リド、遊離脂肪酸の増加があるが、組成の変化が一定ではなく、この測定の感度と臨床的有用性は残された課題である。

尿ではビオチン欠乏によって尿中排泄が異常低下し、 $\beta$ -メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼの活性低下によるロイシン代謝の変化で 3-HIA の異常増加があり、同時にビスノルビオチンの排泄も減少し、ビオチンの生物学的有用性の低下を表している。3-HIA は比較的早期に出現し、ビオチン欠乏の良い指標といわれている。

#### 9. ビオチン摂取

##### 9-1 食事からの摂取

US.DACS, NAANES<sup>□</sup>, BNSS はビオチン摂取を報告していない。Murphy と Calloway(1986)は NHANES<sup>□</sup>からのデータを用いて、18 歳から 24 歳の若い女性の摂取量平均を  $39.9 \pm 26.9$  (SD)  $\mu\text{g/day}$  と概算した。この結果は人工の Canadian diet(62 $\mu\text{g/day}$ )中のビオチンの食事性摂取の概算量と、実際の食事分析 (60 $\mu\text{g/day}$ ) (Hopper et. Al, 1978) よりもかなり低い。英国の成人と小児に対する計算上の平均摂取量は US の概算, 33 と 35 $\mu\text{g/day}$  (Bull and Buss, 1982; Lewis and Buss, 1988) と近似していた。

食品中のビオチン濃度は微生物学的定量法が使われている。ビオチンは種々の食品に含まれ、他のビタミン B 複合体とともに存在している。特にローヤルゼリー (約 400 $\mu\text{g}/100\text{g}$ )、酵母 (200 $\mu\text{g}$ )、レバー (100 $\mu\text{g}$ )、卵黄 (50 $\mu\text{g}$ ) や魚肉 (20 $\mu\text{g}$ ) などに多く含まれているが、肉 (2~10 $\mu\text{g}$ )、野菜 (2~10 $\mu\text{g}$ )、

果物 (1~3 $\mu\text{g}$ ) には少ない。また、食品加工や保存加工によって損失し、残存率は 20~90% (肉では 70%) である。西洋人の食事からのビオチン摂取量は 35~70 $\mu\text{g}$ /日 (143~287nmol/日) と推定されている。

これまでの各国の報告で、ビオチン濃度は 3.9~12.7 $\mu\text{g}/\text{L}$  の範囲で平均 6 $\mu\text{g}/\text{L}$  である。成乳 750mL/日を飲んでいる乳児はビオチン摂取量は 4.5 $\mu\text{g}/\text{日}$  である。腸内細菌叢のビオチン産生がどのように関係しているかは不明である。

#### 9-2 サプリメントからの摂取

1986 年の NIHS によれば、約 17% の US の成人はビオチンを含むサプリメントを服用している (Moss et.al, 1989)。サプリメントからの摂取量について特にデータは得られていない。

ビオチンサプリメントはビオチン摂取に十分役立つものと思われる。ビオチンは哺乳動物の妊娠、胎仔発育・分化、乳児の成長の維持に関与しており、胎仔の形態形成過程において細胞増殖因子として重要な役割を果たしている。乳幼児の食品である調製粉乳は、牛乳が粉ミルクとなる過程とその希釈化によってビオチン総量や生物活性は著しく減少するため、WHO はビオチン添加を勧告し、世界中の粉乳にはビオチンが添加されるようになった。例外はわが国である。わが国の粉ミルク中のビオチン量は母乳や FAO/WHO の推奨値に比べ低値であり、添加されていないために引き起こされた、アレルギー治療用特殊ミルクやメチルマロン酸血症治療用ミルクの摂取によるビ

オチン欠乏症が報告されている。ビオチン添加を早急に実施する必要がある。

ビオチンはまた、高血糖やグルコース利用能との関連が示されており、その他の潜在的なビオチン欠乏状態による疾患も推測され、ビオチンの食品添加物としての有用性に期待できる。

#### 10. ビオチン必要量に影響する因子

ビオチン所要量に影響する因子がいくつか確認されている。すなわち、□大量の生卵摂取の場合、これはビオチンと結合する基質 (アビジン) を含んでいる。□ビオチニダーゼ欠損症 (遺伝的欠損) の場合。□ビオチン異化を誘導する抗ケイレン剤を使用している人の場合。□妊婦である。後者の二つの場合は尿中のビオチンに対するビオチン代謝物の割合が増加する (Mock and Dyken, 1997; Mock and Stadler, 1997; DM Mock et al., 1997b)。妊娠はビオチンの必要量を増加させる。妊婦の尿中のビオチン、ビスノルビオチンの低下、3-HIA の増加、血清ビオチンの低下は、軽度のビオチン欠乏が起きていることを示している。授乳はまたビオチンの必要性を高める。

先天性ビオチニダーゼ欠損症は臨床症状が主として通常の食事摂取の中での副次的な結果として現われるため、ビオチン欠乏症の理解に特に関連している。

#### 10-1 乳児

AI は主にヒト乳を摂取した乳児で観察された平均的ビオチンの取り込みを反映する。ヒトの初期と過渡期乳において、ビオチン

代謝物の濃度はビオチン濃度の2倍近い

(DM Mock et.al,1997 a). 出産後の乳生産の成熟期で、ビオチン濃度は上昇するが、代謝物は総ビオチンの約1/3となる。成熟期乳(出産後21日以上ではビオチン濃度は多様になる(Mock et.al,1992)。すなわち前段階の量を超えてくる。このことは母乳へのビオチンの能動輸送があることを示唆している。Hiranoら(1992)によれば、母乳中の遊離ビオチン濃度は $3.8 \pm 1.2$  (SD)  $\mu\text{g/L}$ (微生物学的定量法)で、加水分解処理後は $5.2 \pm 2.1$   $\mu\text{g/L}$ であり、初期の概算量のbaioasseiによる総ビオチン $4.5$   $\mu\text{g/L}$ (Salmenpera et al, 1985)や $7$   $\mu\text{g/L}$ (Paul and Southgate, 1985)よりもわずかに高い。最近の報告(Hirano et.al,1992)で最高値の結果であるが、他の研究(Paul and Southgate, 1985)の範囲内であり、ヒト母乳のビオチンの濃度は $6$   $\mu\text{g/L}$ と概算された。

#### 10-2 妊娠

最近の二つの研究(Mock and Stadler,1997; DM Mock et.al,1997 b)は以前の発表(NRC,1989)の妊娠期間内のビオチン充分量について疑問を投げかけてきた。いくつかの研究では血漿でビオチン低濃度であることを見出し(Bhagavan, 1969; Dostalova,1984)が、他の研究ではそうではなかった(Mock and Stadler,1997)。DM Mockら(1997 b)は妊娠3ヶ月までの健康な妊婦の半数以上で尿中3-HIAが上昇し、ビオチンの尿中排泄は約50%の妊婦で減少したと報告している。これらの値の変化が妊婦にとって正常なことなのか、低濃度ビオチ

ン吸収が必要性に関係していることを示すのかは判っていない。しかしながら、これらのデータは青年期妊婦を除いては妊娠要求に応えるためのAI増大を判断するには充分ではない。

#### 11. 上限量

ヒトや動物でのビオチンの影響の報告はない。ビオチン反応性先天性代謝異常症と急性ビオチン欠乏症に対して $200\text{mg}$ 以上の経口投与と、静注 $20\text{mg/day}$ で治療した患者において毒性は報告されていない

(Mock,1996)。妊娠前後のラットに対して $10\text{mg}/100\text{g}$  body weightの急性投与が胎児と胎盤の発育を阻害したという研究報告がいくつもある(Paul and Dutttagupta, 1975, 1976)。この投与量は $70\text{kg}$ のヒトに対して $70\text{g}$ 投与に等しく、推奨摂取量よりもはるかに多い。これらの結果は大量投与で、しかも投与方法と手段( $0.1\text{mol/L}$ の皮下注射、これ自体が毒性があるだろう)、適正な対照群が欠落しているため、ヒトの摂取量に対して上限量(UL)を導くには有用であるとは思われない。

高ビオチン摂取の影響についてのデータは定量的危険評価に対して不十分であり、ULは引き出せない。高ビオチン摂取を含むいくつかの研究は影響がないことを報告している。Koutsikos et al(1996)は血液透析患者に対する $50\text{mg}$ のビオチン静注で副作用がなかったと報告している。Roth et.al(1982)は妊娠の9ヶ月間 $10\text{mg/day}$ を投与し、母親と乳児に影響がなかったと報告している。Ramaekers et.al(1993)は先天性代謝異常の



MCDの15歳の少年に10mg/dayを投与し、副作用は認められなかったと報告している。Colamaria et.al(1989)は同様に無気力・薄毛・自閉症様挙動・間代性筋痙攣・薬物抵抗性発作を伴う症候群の乳児に10mg/day投与で影響なしとの報告をしている。合わせてみると、これらの研究は将来のビオチンの毒性研究の中で、摂取量の可能範囲を示唆している。

## 1.2. 生体利用率

Hamid M Said (1999)によれば、生体利用率については次のように考えられている。栄養素ビオチンに対する興味の増大にもかかわらず、ビオチンの生体利用率と栄養学的な位置づけに関して重要かつ基本的な内容は解明されていない。ZempleniとMockの論文は、重要な生体利用率の知見について意義深い寄与をしている。ビオチンが6名の健康成人に対し経口的に投与(2.1, 8.2, 89.1 $\mu$ mol)され、連続した24時間の中で、ビオチンとビオチン代謝物の増加した尿中排泄量はビオチンとビオチン代謝物について特異的に定量をした。生体利用率はビオチンの中間範囲の投与量(18.4 $\mu$ mol)で排泄されたビオチンとビオチン代謝物の合計とよく似ていた。2名の最大経口投与では約100%であった。理由は理解できないが、最少量投与では回収率は200%の生体利用率であった。100%以上の生体利用率を明瞭に説明できないにもかかわらず、ZempleniとMockの研究はビオチンの生体利用率についてのわれわれの理解にとって意義深いものである。なぜなら、進歩した分析手法

を用いているからである。ビオチンとビオチン代謝物はHPLCを用いてビオチンとビオチン代謝物を分離し、続いてアビジン結合法でそれぞれの標準曲線によって個々に測定しているからである。これまでの研究でも経口投与後のビオチンの尿排泄の増加を測定しており、生体利用率は投与量に対する尿中へのビオチン排泄の割合を計算している。しかし、微生物学的定量法はほとんどのビオチン代謝物を検出できず、アビジン結合法はビオチン代謝物のアビジンへの弱い結合親和性を考慮していない、という定量法を用いていた。ビオチン代謝物は尿中で分子量としてビオチンとビオチン代謝物の合計の約1/2と計算されるため、最近の研究はビオチンの生体利用率を有意に少なく見積もっているようである。さらにその上に、最近の研究は対照として静脈投与を使っていない。

最近の研究の中で、研究者は測定された生体利用率(24-58%)は多分最少の概算量であることを認識している。ビオチンの薬物学的投与は通常ビオチン依存的な先天性代謝異常への処置に使われる。したがって、ZempleniとMockによる研究結果はビオチン大量投与が正当であった小グループ直接的に有効であった。その上、薬物学的投与時のビオチンの高い生体利用率の発見は少なくとも生体利用率は低濃度投与においても高くなるだろうと予測できるいくつかの基礎を少なくとも提供するものである。不幸にしてラジオアクティブなビオチンの投与を避けることの要望が、トレーサーと薬物投与において安定したアイソトープ標

識バイオチンと確立されたマススペクトル法による尿中アイソトープ標識バイオチン測定を妨げる風潮となっている。

### 1.3. バイオチンの目安量

食事摂取基準の策定においては、日本人を対象としたデータはほとんどなく、多くの場合、食生活が異なる欧米人のデータが用いられている。このため、現在用いられている食事摂取基準は、わが国の食生活を十分に反映しているとは云えない。「日本人の食事摂取基準（2005年版）」において、バイオチンやパントテン酸など5種類の水溶性ビタミンは推定平均必要量から推奨量が求められず、目安量の設定となっている。バイオチンの食事摂取基準の策定においては、東京都のトータルダイエツト調査（TDS）によるバイオチン摂取量が科学的な根拠として用いられている。この調査結果に基づき、健常な成人男女のバイオチンの目安量が45 $\mu$ g/日と策定されている。

TDSは、従来、残留農薬や食品添加物などの1日摂取量を算出するために作成された方法である。しかしながら、TDSは、栄養素の食事からの摂取量をモニターしたり、食事摂取基準に対する充足率を評価するためにも重要な調査方法である。またTDSを利用して、栄養素の供給源や寄与率、つまりどんな食品からどれだけ摂取しているかを明らかにすることも可能である。微量栄養の摂取量を算出するためには、食事調査では、一般に、対象者の負担やリコールバイアス、試料分析の手間や費用などが問題

となるが、TDSでは、固有の問題点として、食品群の分類、食品の選択、対象とする食品数、選択基準、均一化、代表値の決め方などについての検討が必要である。

東京都のTDSは、残留農薬のプロトコールに基づいて平成13年度に行われたものである。しかし、平成11年度の東京都栄養調査の摂取量を利用して、バイオチンの摂取量を45.1 $\mu$ g/日と算出している。栄養調査では、平成13年度から、食品の食形態を考慮して摂取量を記載することになった。たとえば、米類の摂取量が、平成11年度では国民栄養調査および東京都栄養調査でそれぞれ190.5g（男性）および140.9gであるのに対して、平成14年度ではそれぞれ417.9g（男性）および301.2gと、両年度で著しい差異が認められた。また嗜好飲料、調味料及び香辛料類の摂取量も、東京都栄養調査では平成11年度で207.2gであるのに対して、平成14年度で709.5gと、3倍の違いがあった。つまり、分析した食品群のバイオチン含量を基に、平成11年度の摂取量を利用して、バイオチン摂取量を算出すると過少評価となると考えられる。著者らが、実際に平成14年度および15年度の東京都栄養調査の摂取量を利用して、バイオチンの摂取量を算出すると65 $\mu$ gとなる。

著者らは、分析したバイオチン含量および国民栄養調査の結果を利用して、バイオチンの摂取量の算出を試み、東京都のTDSの結果との比較検討を行った。両者のバイオチン摂取量には大きな違いが認められたが、TDSは栄養素の摂取量を求めるために有用な方法と考えられる。現在、TDSによって

残留農薬の摂取量の調査が行われている。  
これと並行して、ある種の栄養素については摂取量の推定を行うことが可能である。  
今後 TDS を利用して、ビタミンやミネラルの摂取量を算出することは、わが国の食事摂取基準を策定するための有効な手段として期待される。

最後に、表 1 に示したように、これまでのビオチンの摂取量に関する国内学のデータをまとめると、成人におけるビオチンの 1 日あたりの必要量は 50 $\mu$ g であると推定できる。

#### 1 4 . 主な文献

- Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA: Dihydro-vitamin K1: Primary food sources and estimated dietary intakes in the American diet. *Lipids* 31, 715-720 (1996)
- Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA: Food sources and dietary intakes of vitamin K-1 (phylloquinone) in the American diet: Data from the FDA total diet study. *J Am Diet Assoc* 96, 149-154 (1996)
- Chen J, Gao J: The Chinese total diet study in 1990. Part II. Nutrients. *J AOAC Internat* 76, 1206-1213 (1993)
- van Dokkum W, de Vos RH, Cloughley FA, Hulshof, KFAM, Dukel F, Wijsman JA: Food additives and food components in total diets in The Netherlands. *Br J Nutr* 48, 223-231 (1982)
- van Dokkum W, de Vos RH, Muys Th, Wesstra JA: Minerals and trace elements in total diets in the Netherlands. *Br J Nutr* 61, 7-15 (1989)
- van Dokkum W, de Vos RH, Dukel F, Hilwig GNG : Analysis of macrocomponents and fatty acids in the market basket of male adolescents in the Netherlands. *J Am Diet Assoc* 90, 77-81 (1990)
- Egan SK, Tao SS, Pennington JA, Bolger PM: US food and drug administration's total diet study: Intake of nutritional and toxic elements, 1991-1996. *Food Addit Contam* 19, 103-125 (2002)
- Iyengar GV, Kawamura H, Parr RM, Miah FK, Wang J-X, Dang HS, Djojotubroto H, Cho S-Y, Akher P, Natera ES, Nguy MS: Dietary intake of essential minor and trace elements from Asian diets. *Food Nutr Bull* 23, 124-128 (2002)
- Lombardi-Boccia G, Aguzzi A, Cappelloni M, di Lullo G, Lucarini M: Total-diet study: Dietary intakes of macro elements and trace elements in Italy. *Br. J Nutr* 90, 1117-1121 (2003)
- Ophaug RH, Singer L, Harland BF: Estimated fluoride intake of 6-month-old infants in four dietary regions of the United States. *Am J Clin Nutr* 33, 324-327 (1980)
- Ophaug RH, Singer L, Harland BF: Dietary fluoride intake of 6-month and 2-year-old children in four dietary regions of the United States. *Am J Clin Nutr* 42, 701-707 (1985)
- Pennington, JAT (1983) Revision of the total diet study food list and diets. *J. Am. Diet. Assoc.*, 82-166-173.
- Pennington JAT, Wilson DB: Daily intakes of nine nutritional elements: Analyzed vs. calculated values. *J Am Diet Assoc* 90,

- 375-381 (1990)
- Pennington JA, Schoen SA: Total diet study: Estimated dietary intakes of nutritional elements, 1982-1991. *Internat J Vitam Nutr Res* 66, 350-362 (1996)
- de Vos RH, van Dokkum W, Olthof PDA, Quirijns JK, Muys T, Van der Poll JM: Pesticides and other chemical residues in Dutch total diet samples (June 1976-July 1978). *Food Chem Toxicol* 22, 11-21 (1984)
- World Health Organization : Pesticide Residues in Food. Technical report series no. 592, Geneva: WHO (1976)
- World Health Organization : Guidelines for the Study of Dietary Intakes of Chemical Contaminants. Technical report series no. 592, Geneva: WHO (1985)
- 健康・栄養情報研究会編：国民栄養の現状。平成11年度厚生労働省国民栄養調査結果。第一出版，東京 (2001)
- 健康・栄養情報研究会編：国民栄養の現状。平成14年度厚生労働省国民栄養調査結果。第一出版，東京 (2004)
- 健康・栄養情報研究会編：国民栄養の現状。平成13年度厚生労働省国民栄養調査結果。第一出版，東京 (2003)
- 厚生省：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，東京 (1999)
- 厚生労働省：日本人の食事摂取基準 (2005年版)。平成16年11月22日，建白社，東京 (2005)
- 齋東由紀，牛尾房雄：トータルダイエット調査による東京都民のビオチン，ビタミンB6，ナイアシンの一日摂取量の推定。栄養学雑誌 62, 165-169 (2004)
- 食品成分研究調査会編：五訂日本食品標準成分表。医歯薬出版，東京 (2001)
- 食品添加物協会編：あなたが食べている食品添加物-食品添加物1日摂取量の実態と傾向-，日本食品添加物協会，東京，pp.67-82 (2001)
- 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・食糧雑誌 (印刷中)
- 坪野吉孝，久道茂：栄養疫学，南江堂 (2001)
- 東京都衛生局編：東京都民の栄養状況。東京都，東京 (1999)
- 東京都衛生局編：東京都民の栄養状況。東京都，東京 (2002)
- 東京都衛生局編：東京都民の栄養状況。東京都，東京 (2003)
- 細貝祐太郎，松本昌雄監修：食品安全セミナー2，食品添加物，中央法規出版，東京，pp.83-97 (2001)
- 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会：五訂増補日本食品標準成分表。国立印刷局，東京 (2005)
- 渡邊敏明，大串美沙，福井徹：わが国の実年者におけるビオチンの体内動態についての検討。生物試料分析 27, 403-408 (2004)

表1. 各国におけるビオチン摂取量の比較

文献	摂取量 µg/日	対象	調査法
Hoppner <i>et al.</i> , 1978	62.0 60.0	成人男女 (カナダ)	食事記録調査 陰膳法
Bull and Buss, 1982	35.5	7,277世帯 (イギリス)	食事記録調査
Murphy and Calloway, 1986	39.9±26.8	女性1,066名 (18~24歳) (アメリカ)	24時間思い出し法
Lewis and Buss, 1988	35-70	6,925世帯 (18,855人) (イギリス)	食事記録調査
Bliss <i>et al.</i> , 2000	32±12	成人男女39名 (25~85歳) (アメリカ)	連続8日間出納試験
Iyenger <i>et al.</i> , 2000	35.5±7.5	成人男性 (25~30歳) (アメリカ)	トータルダイエツ調査
渡邊ら, 2004	29.8-33.3	中高齢者 120名 (男女各60名, 45~76歳) (東北地方)	陰膳法
斎東と牛尾, 2004	45.1	成人男女 (東京都民)	トータルダイエツ調査
谷口ら, 2005	109.8 92.8	成人男性 (2001年度国民栄養調査結果) 成人女性 (2001年度国民栄養調査結果)	食品群別計算法 (17食品群)
渡邊と谷口, 2006	60.7	成人男女 (2002年度国民栄養調査結果および東京都民)	東京都トータルダイエツ調査 再解析
谷口と渡邊 (投稿中)	51.4 54.8	成人男女 (2004年度国民栄養調査結果)	トータルダイエツ調査 食品群別計算法 (98食品群)
渡邊ら, 2007	52.6	成人男女 (2003年度近畿/京阪神地区)	トータルダイエツ調査

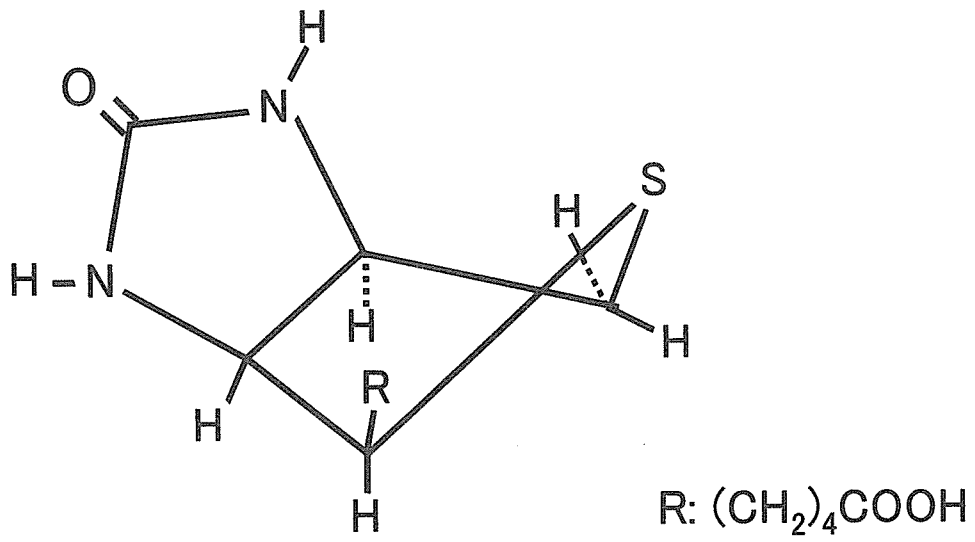


図1. ビオチンの絶対構造

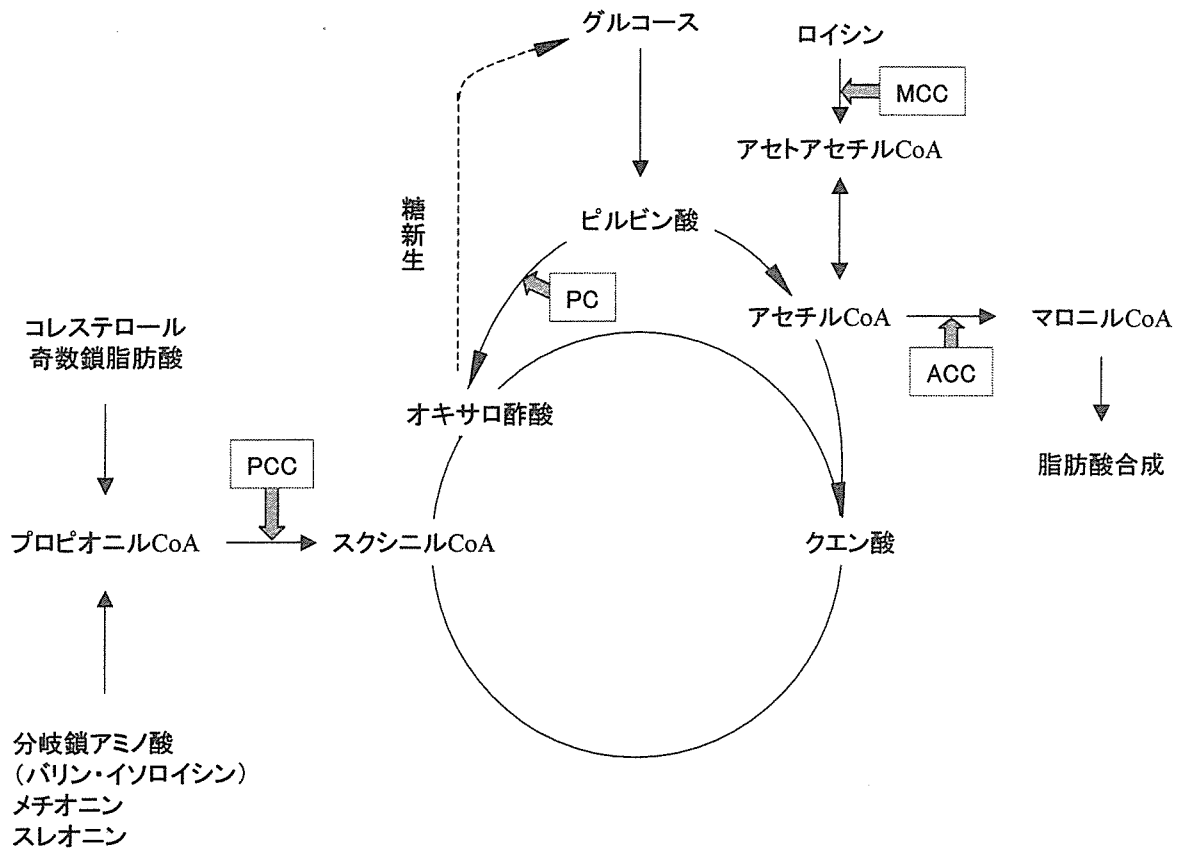


図2. カルボキシラーゼが関与している代謝経路

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  
平成 16 年度～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 柴田 克己

I. 総合研究報告

7. ビタミン C と葉酸の必要量に関する検討

分担研究者 梅垣 敬三 国立健康・栄養研究所

要旨

ビタミンの必要量ならびに上限摂取量の策定には、信頼できる分析法の設定、摂取量を反映する適切な生体指標の選定、有用性評価に関する情報が要求される。そこで本研究ではビタミン C と葉酸を取り上げ、分析法、摂取量を反映する生体指標、有用性評価において注目すべき事項を検討することとした。その結果、ビタミン C 分析法としては電気化学検出 (ECD) -HPLC 法が食品中と微量の生体試料の分析にも適用できる信頼できる方法であること、また葉酸の分析法はクロラムフェニコール耐性の *L.casei* を用いた微生物学的測定法が簡便であり、多様な化学形態の葉酸分析には適していることを示した。ビタミン C の体内レベルの評価において、酸化ストレスを受けている糖尿病患者では血漿ビタミン C 濃度は低下せず、リンパ球ビタミン C 濃度が低下するという現象を認め、リンパ球中のビタミン C 濃度が必要量を考慮する一つの指標になりうることを示した。葉酸については、その染色体の安定化に着目した検討を動物実験と被検者実験において行い、組織中の葉酸が飽和する以上の葉酸の摂取には有益な影響が認められないことを示した。ラットを利用した食品中の葉酸の生体利用率の評価系を設定し、日本人の葉酸の供給源と考えられる緑茶中葉酸の生体利用率が低いことを明らかにした。また動物実験において酸化ストレスを負荷すると体内葉酸レベルが低下することから、酸化ストレスが葉酸の必要量を考慮する要因になりうることを示した。



## A. 研究目的

ビタミンの食事摂取基準策定において食事からのビタミンの摂取量と体内レベルを把握することが重要になる。そのためには食品ならびに生体試料中のビタミンが迅速かつ適切に分析できる方法・条件の設定、ビタミンの生体内レベルを適切に評価できる生体指標の選定が要求される。またビタミンの必要量を考慮すべき要因についても検討も必要である。

ビタミンCも葉酸も不安定であり、その測定のために適切な前処理が必要である。ビタミンCの測定法については、一般に食品中のビタミンCは通常ヒドラジン-UV-HPLC法で測定されているが、電気化学検出(ECD)-HPLC法による分析が容易と考えられる。葉酸については、食品中ならびに生体試料中でも多様な形態で存在しており、全ての葉酸を測定するには微生物学定量法が適している。

ビタミンの必要性を判断する指標としては、血漿ビタミンC濃度が測定されているが、生体内レベルを反映するものとして白血球中の濃度が注目されている。葉酸の必要量は血漿や血球の葉酸濃度、ならびに血漿ホモシステイン濃度が利用されているが、葉酸は染色体の安定性に寄与することから、染色体の安定性を指標とした葉酸の必要性の評価法もある。また葉酸については食品中の生体利用性が低く、食品によってもその利用性が異なると考えられている。日本人の葉酸の摂取において日常摂取している緑茶由来の葉酸の寄与率が高いとの報告があるが、緑茶中の葉酸の生体利用性につい

て検討した報告は見当たらない。

そこで本研究では、ビタミンCと葉酸について、食事摂取基準の策定に参考となる分析方法、体内レベルの評価指標などについて検討した。

## B. 研究方法

### 1) 理化学的な分析方法

ビタミンCはヒドラジン-UV-HPLC法ならびに既報のECD-HPLC法で行った。食品の分析試料は細切したのち5%メタリン酸溶液とケイ砂で磨砕抽出し、適宜希釈してヒドラジン-UV-HPLC法ならびにECD-HPLC法による分析試料とした。血液は肘正中皮静脈より採取し、直ちに4℃、 $1,000 \times g$ で15分間、遠心分離して血漿を採取した。この残りの白血球層を別に分取して1 mlの2 mM EDTA含有PBSと混合後、Ficoll-Paque™ PLUS 0.2 mlを下層に注入し、室温、 $4,500 \times g$ で4分間遠心してリンパ球層を分離した。得られたリンパ球は2 mM EDTA含有PBSで数回洗浄の後、5%メタリン酸に懸濁させ、ECD-HPLC法による分析試料とした。HPLC-ECDの分析条件としては、カラムに資生堂カプセルパック C18 (UG120, 4.6 x 100 mm)を用い、移動相は200  $\mu$ M EDTA及び500  $\mu$ M 塩化n-ドデシルトリメチルアンモニウム含有200 mMリン酸-リン酸カリウム緩衝液(pH 3.0)、流速は0.9 ml/min、ECD加電圧は+350 mV(Ag/AgCl)、試料の注入量は2  $\mu$ lとした。ヒドラジン-UV-HPLC法の分析条件としては、カラムにセンシュー科学 Silica-2150-N (100) 6 mm x 150 mm)を用い、移動相は酢酸・n-ヘキ

サン・酢酸エチル混液 (1 : 4 : 5 v/v/v), 流速は 1.5 ml/分, 検出器は可視吸光検出器 (495 m), 注入量は 20  $\mu$ l とした.

葉酸の測定はクロラムフェニコール耐性 *L.casei*(ATCC27773) を用いた微生物学的方法を採用した. 葉酸標準品はホリニン酸カルシウム塩五水和物, 葉酸定量用培地は Difco 社製を利用した. 菌体の濁度はマイクロプレートリーダー (コロナ電気株式会社) を用いて測定した. 葉酸測定用の試料調製として, 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, 全血はポリグルタミン酸鎖を切断するため 37°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. 臓器は 9 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°C, 30 分間加熱し, 葉酸を抽出した後に遠心 (2500  $\times$  g, 15 min, 4°C) した上清をラット血清由来のコンジュガーゼで処理し測定試料とした. 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.

## 2) 生体指標に関する動物実験

葉酸投与後の体内葉酸レベルを評価する目的で, 市販固形試料 CE-2 (日本クレア(株)) を自由摂取させた Wister 系雄ラット (7 週齢) に単回, あるいは 1 日一回 7 日間, 葉酸 0.33 mg/kg 体重 (0.1 mg/0.4 mL/300 g 体重) を胃内投与し, その後の血漿と赤血球の葉酸濃度の変動を測定した. また, 茶中の葉酸の生体利用率を検討するため Wister 系雄

ラット (7 週齢) に AIN-93G4 組成を基本に調製した低葉酸食 (葉酸無添加), もしくは基本食 (葉酸 2 mg/kg 飼料) を 3 週間自由摂取させて組織中の葉酸濃度を低下させ, その後にラットを①コントロール群 水, ②カテキン群 EGCg 29.3 mg/kg BW, ③葉酸群 Folic acid 116.7  $\mu$ g/kg BW, ④葉酸+カテキン群 Folic acid 116.7  $\mu$ g/kg BW + EGCg 29.3 mg/kg BW, ⑤緑茶群 208.6 mg/kg BW (Folic acid 116.7  $\mu$ g/kg BW, EGCg 29.3 mg/kg BW 含有) の 5 群に分け, 該当するカテキン, 茶抽出物, または葉酸をそれぞれ 1 週間胃内投与した.

## 3) タミン C の生体指標に関するヒト試験

糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミン C 濃度を測定した. 被験者は 41 人の 2 型糖尿病患者 (平均年齢 63 歳, 男性 25 人と女性 16 人) であり, 空腹時の血糖は 137 mg/dl, ヘモグロビン A1c 7.1% であった. またこれらの患者の中で合併症のある患者は 26 人, 合併症のない患者は 15 人であった. 対象とした健常人は年齢ならびに性別を合わせた 50 人 (男性 31 人と女性 19 人) であった.

## 4) 色体の安定性を指標とした葉酸の必要量に関する検討

動物実験では 4 週齢 ICR 系雄マウスに AIN-93G 組成を基本に調製した低葉酸食 (葉酸無添加), 基本食 (葉酸 2mg/kg 飼料), 高葉酸食 (葉酸 40 mg/kg 飼料) の 3 種類の固形飼料を 4 週間摂取させた後, X 線 (0.5 Gy) を無麻酔下で全身照射して骨髄染色体損傷を誘発し, 骨髄染色体損傷を小核試験によ

り評価した。同時に組織中の葉酸濃度も測定した。被検者実験では、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て、葉酸投与群には800 µg/日の葉酸を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、リンパ球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。

酸化ストレス負荷による体内葉酸濃度の変化についての検討は、マウスに種々の線量のX線照射し、骨髄、肝臓、血漿の葉酸濃度の変動をビタミンCやEと比較検討した。

(倫理面への配慮)

実験は倫理委員会の承認を得た後、個人情報等や倫理に関係した事項を遵守して行った。

## C. 研究結果

### 1) ビタミンの信頼できる分析方法の設定

17種類の野菜や果物のビタミンCの測定をヒドラジン-UV-HPLC法とECD-HPLC法と比較したところ、総ビタミンC(還元型+酸化型)としては同様の値を得ることができた(図1)。また、ECD-HPLC法により測定した野菜や果物中のビタミンCはほとんどが還元型であった。図2に示したようにヒドラジン-UV-HPLC法に比べて、ECD-HPLC法は、測定操作のステップが少なく、また酸化型と還元型の両方を迅速、簡便、高感度に測定できるという特徴があった。ビタミンCの生体内濃度を反映する指標としては、血漿と血球があるが

ECD-HPLC法では微量の白血球でもビタミンCが十分に測定できた。また血球の中でリンパ球は、細胞の調製が容易に短時間に調製できることから、体内ビタミンCレベルの評価対象試料として適していた。

葉酸の分析は、クロラムフェニコール耐性L.casei(ATCC27773)を用いた微生物学的方法とマイクロプレートを利用した方法が簡便で優れた方法と考えられた。この方法では20 pMから400 pMの範囲内では菌体の生育反応曲線を得ることができ、測定感度も高かった。検出限界はおおよそ5 pMと考えられた。測定感度が高いことから定量に使用する器具類等は、葉酸が混入しないように十分注意する必要がある。

### 2) 生体指標に関する動物実験

ラットの実験において葉酸を1回、または7日間連続経口投与したとき、血漿では葉酸投与によるその濃度の増加をある程度検出できたが、赤血球では検出することはできなかった。低葉酸食で3週間飼育したラットに葉酸を経口投与した条件においても、葉酸投与によるその濃度の増加は血漿では検出できたが赤血球では検出できなかった。この結果は、少なくとも1週間程度での葉酸投与の影響は、赤血球では評価できないが、血漿ではある程度評価できることを示唆した。

葉酸欠乏食で4週間飼育したラットに葉酸あるいは緑茶(葉酸含有)を1週間投与したところ、血漿、肝臓の葉酸は、葉酸投与では有意に増加し、また低葉酸状態で増加していたホモシス테인濃度の低下も認

められた。しかし、緑茶では組織中の葉酸濃度の増加も僅かであり、血漿ホモシステイン濃度の低下もほとんど認められなかった。この結果から、緑茶の葉酸は生体利用性が低いことが示唆された。

### 3) ビタミンCの生体指標に関するヒト試験

糖尿病患者では血漿ビタミンC濃度は健常者と差異はなかったが、リンパ球中のビタミンC濃度が健常者に比べて有意に低かった(図3)。さらに合併症を持っている患者のリンパ球ビタミンC濃度は、合併症を持たない患者に比べて有意に低かった。この結果から、リンパ球中のビタミンC濃度の変動がビタミンCの必要性を評価する一つの指標になりうることを示唆された。

### 4) 染色体の安定性を指標とした葉酸の必要量に関する検討

マウスの実験において、4週間の低葉酸の負荷のみでは骨髄染色体損傷度の増強は認められなかったが、X線全身照射した条件では骨髄染色体損傷が低葉酸食群で著しく高かった(図4)。一方、基本食群と高葉酸食群では差異がなかった。これらのX線照射による染色体損傷は骨髄葉酸濃度とよく対応していた。すなわち低葉酸食群で低く、基本食群と高葉酸食群では差異がなかった。血漿の葉酸濃度は飼料中の濃度と対応し、低葉酸群、基本食群、高葉酸食群の順に高くなった。この結果は、血漿葉酸濃度が飽和していない条件でも組織中の葉酸濃度が飽和していることを示唆した。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とは、血漿よりも組織中の葉酸濃度が体内状態を反映するよい指標であることを示した。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。そしてX線照射の有無にかかわらずリンパ球染色体損傷は葉酸投与で全く影響を受けなかった。この結果はマウスの実験同様、被検者のリンパ球葉酸濃度が飽和しており、葉酸投与の影響が出にくいことを示唆した。

酸化ストレス負荷による体内葉酸濃度の変化を検討するため、マウスに種々の線量のX線照射し、骨髄、肝臓、血漿の葉酸濃度の変動をビタミンCやEと比較検討した。その結果、X線照射により血漿、骨髄の葉酸が照射線量と照射後の時間に依存して低下した。特に血漿ではよく知られている酸化ビタミンのEやCに変動はないが、葉酸は有意に低下した。この現象を確認するためインビトロでマウスの血漿にX線(3 Gy)を照射したところ、この条件においても葉酸は有意に減少したが、ビタミンCとビタミンEの濃度に変化は認められなかった(図5)。

## D. 考察

葉酸は多様な形態を有する化学物質の総称であり、それらを全て分析するには葉酸要求性の菌体を利用した微生物学的定量法が適している。微生物学的定量法の中でもクロラムフェニコール耐性のL.casei