

尿中ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py 各含量を測定とした⁹⁾。また, 尿中 MNA 含量を HPLC 法で測定した¹⁰⁾。詳細は II-21 に記載した。

パントテン酸を測定するために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¹¹⁾。詳細は II-21 に記載した。

葉酸を測定するために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 を用いた微生物学的定量法にて測定した¹²⁾。詳細は II-21 に記載した。

尿中クレアチニンの分析方法の詳細は II-21 に記載した。

5. 統計学的解析

スポット尿中水溶性ビタミン排泄量はクレアチニンあたりで補正し, 数値はすべて実測値で表した。相関をみるためには GraphPad Prism Ver. 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego California, USA) を用いた。検定は, Correlation で行い, $p < 0.05$ で相関が認められたと判断した。

C. 結果

小学生は, 表 1 に示した通り, ビタミン B₂ においては $n = 54$ 有意確率 $p < 0.001$, 相関係数 $r = 0.500$ で高い相関があった。ビタミン B₁, B₆, B₁₂, ナイアシン, パントテン酸, 葉酸, アスコルビン酸においては $n = 45 \sim 74$, $r = -0.0643 \sim 0.2859$ であり相関はなかった。

大学生は, 表 2 に示した通り, ビタミン B₁ においては $n = 62$ 有意確率 $p = 0.053$, 相関係数 $r < 0.001$ であり, ビタミン B₂ においては $n = 61$, $p = 0.0068$, $r = 0.343$ であり, ビタミン B₆ においても $n = 63$, $p < 0.001$, $r = 0.62$

であり, ナイアシンにおいては $n = 650$, $p = 0.018$, $r = 0.292$ であり, これらのビタミンに関しては相関が認められた。ビタミン B₁₂, パントテン酸, 葉酸, アスコルビン酸においては $n = 66 \sim 68$, $r = -0.0719 \sim 0.267$ であり相関はなかった。

高齢者は表 3 に示した通りビタミン B₂ においては $n = 42$, $p < 0.001$, $r = 0.498$ であり, パントテン酸においては $n = 44$, $p = 0.0015$, $r = 0.41$ であり, この二つのビタミンにおいて相関が認められた。B₁, B₆, B₁₂, ナイアシン, 葉酸, アスコルビン酸においては $n = 43 \sim 46$, $r = -0.0522 \sim 0.2760$ であり相関はなかった。

D. 考察

尿中に排泄される水溶性ビタミンと食事調査によって摂取している水溶性ビタミン量の相関はビタミン B₂ に限り小学生, 大学生, 高齢者のすべてに見られた。他のビタミンに関しては大学生でビタミン B₁, ビタミン B₆, ナイアシンで有意な相関が認められ, 高齢者ではパントテン酸で相関が見られた。これらのビタミンがすべての年齢層で相関が見られなかったのは, 本研究がスポット尿を用いた栄養評価のための予備実験的な位置づけであり, サンプル数が不足していることや, フリーリビングであることに起因していると考えられる。すべてのビタミンに関して, さらに精製食を利用した介入試験を行ったり, 調査範囲をさらに拡大してサンプル数を増加させたりすることによって精度が向上すると考えられる。すべてのビタミンに相関が認められれば, 多くの水溶性ビタミンに関してスポット尿は個々人の栄養状態を反映する有用なバイオマーカーとなりえる。

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. 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
2. 主任研究者 柴田克己. 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) の策定に関する研究. 平成 18 年度 総括・分担研究報告書, 平成 19 年 3 月
3. Sasaki S, Yanagibori R, Amano K. Validity of a self-administered diet history questionnaire for assessment of sodium and potassium: comparison with single 24-hour urinary excretion. *Jpn Circ J.* (1998) 62,431-435.
4. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. Lipidchromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin. Chem.* (1982) 28, 29-31
5. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己. 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*(2004) 45, 231-238.
6. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol. Chem* (1983) 258, 5623-5628.
7. Gregory JF, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr* (1979) 32, 879-883.
8. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric. Food. Chem* (1998) 46, 5177-5180.
9. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
10. Shibata K. Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.
11. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic

acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.

12. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis : Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatments. *J Nutr Sci Vitaminol*, (1998) 44, 361-370.

表 1. 小学生のスポット尿中水溶性ビタミン排泄量と水溶性ビタミン摂取量との相関

Vitamins	有意確率 (<i>p</i>)	相関係数 (<i>r</i>)	サンプル数 (<i>n</i>)
B ₁	0.0569	0.2859	45
B ₂	< 0.001*	0.5006	54
B ₆	0.1969	0.1751	56
B ₁₂	0.6197	-0.05864	74
ナイアシン	0.9064	-0.01638	54
パントテン酸	0.638	-0.06426	56
葉酸	0.7245	-0.05057	51
アスコルビン酸	0.0694	0.2467	55

表 2. 大学生のスポット尿中水溶性ビタミン排泄量と水溶性ビタミン摂取量との相関

Vitamins	有意確率 (<i>p</i>)	相関係数 (<i>r</i>)	サンプル数 (<i>n</i>)
B ₁	< 0.001*	0.5329	62
B ₂	0.0068*	0.3431	61
B ₆	< 0.001*	0.6201	63
B ₁₂	0.8656	-0.07194	68
ナイアシン	0.0184*	0.2916	65
パントテン酸	0.3748	0.03481	67
葉酸	0.6152	0.06302	66
アスコルビン酸	0.0268	0.2685	68

表 3. 高齢者のスポット尿中水溶性ビタミン排泄量と水溶性ビタミン摂取量との相関

Vitamins	有意確率 (<i>p</i>)	相関係数 (<i>r</i>)	サンプル数 (<i>n</i>)
B ₁	0.4209	0.1260	43
B ₂	< 0.001*	0.4975	42
B ₆	0.7398	-0.05215	43
B ₁₂	0.6893	0.06127	45
ナイアシン	0.9126	0.01663	46
パントテン酸	0.0015*	0.4128	44
葉酸	0.8981	0.01942	46
アスコルビン酸	0.0634	0.2760	46

平成 19 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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明－

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. ビタミンE 摂取量が血中トコフェロール濃度および尿中トコフェロール代謝産物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

分担研究者 岡野 登志夫 神戸薬科大学 教授

研究要旨

ビタミンE 摂取量の違いによって、血清中トコフェロール濃度および尿中トコフェロール代謝産物排泄量がどのように変動するか、ヒトを対象として調べた。19～55 歳の健康な男性 10 人に対して 1 週目は通常食を与え、2～4 週目にはそれぞれ 9, 27, 54 mg の α -トコフェロールを付加し、血清中トコフェロール濃度とその尿中代謝物量を測定した。血清中 α -トコフェロール濃度は摂取量依存的に増加し、その一方で血清中 γ -トコフェロール濃度は摂取量依存的に減少した。 α -トコフェロール尿中代謝物である 2,5,7,8-テトラメチル-2(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン (α -CEHC) の 24 時間尿中排泄量は摂取量依存的に増加したが、 γ -トコフェロールの尿中代謝物である 2,7,8-トリメチル-2(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン (γ -CEHC) の尿中排泄量は摂取量の影響を受けなかった。 α -トコフェロール摂取による尿中 α -CEHC 排泄量の増加率は、血清中 α -トコフェロール濃度の増加率よりも高かったことから、尿中 α -CEHC 排泄量の測定によってビタミン E の栄養評価を行うことができる可能性が示された。

A. 目的

食事より摂取されたビタミンEは、胆汁酸とミセルを形成し、腸管から吸収される。ビタミンEの吸収率は、51~86%とする報告¹⁾、21%あるいは29%とする報告²⁾などあり、現段階では明らかにされていない。ビタミンEは代謝されて主としてカルボキシエチルヒドロキシクロマン (CEHC) のグルクロン酸抱合体として尿中へ排泄される^{3,4)}。標識した α -トコフェロールをラットの血中に投与した研究において、尿中には投与量の約30%がその代謝物である α -CEHCとして排泄されることが報告されているが⁵⁾、ビタミンEの体内動態はまだ不明な点も多い。

日本人の食事摂取基準 (2005 年度版) においては、ビタミンEは血中や組織内に存在する大部分のビタミンE同族体が α -トコフェロールであることから、 α -トコフェロールのみを指標に食事摂取基準が策定された⁶⁾。しかし、ヒトにおいて α -トコフェロール摂取によって尿中Na排泄量が増加することや⁷⁾、 γ -トコフェロールと γ -CEHCには抗炎症作用を持つ可能性があること^{8,9)}が報告されていることから、 γ -トコフェロールとその代謝物である γ -CEHCの機能に興味をもたれる。本研究では、ヒトに様々な量の α -トコフェロールを摂取させたときの血中 α -、 γ -トコフェロール、その主要な尿中代謝物である α -、 γ -CEHCの変動について調べた。

B. 実験方法

1. 被験者

19~55歳 (25.6 ± 10.4 歳) の健康な男性10名を被験者とした。本研究は滋賀県立大学倫理委員会において承認を受けたものである。

2. 実験計画

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Day 1からDay 4の4日間、被験者は規定食を摂取し、水分は指定のミネラルウォーターを自由摂取とした。五訂増補日本食品標準成分表¹⁰⁾を用いて1日分の規定食に含まれる α -トコフェロール量を算出すると、8.7mgであった。各週のDay 5からDay 7は自由摂取とした。1週目のDay 5から2週目のDay 4までの7日間は、ビタミン混合①を、2週目のDay 5から3週目のDay 4までの7日間は、ビタミン混合②を、3週目のDay 5から4週目のDay 4までの7日間は、ビタミン混合③を摂取した。ビタミン混合①、②、③に含まれるビタミンEは、 α -トコフェロールとして、それぞれ9, 27, 54mgである。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Day 5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、血清を処理し、使用するまで-20℃で保存した。

各週Day 4の2回目の尿からDay 5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、使用するまで-20℃で保存した。

3. 分析

血清中トコフェロールの測定は、玉井ら¹¹⁾、阿部ら¹²⁾の方法にて行なった。

尿中トコフェロール代謝物である α -CEHC、 γ -CEHCの測定は、Yoshikawaら⁷⁾、Lodgeら

¹³⁾, Stahl ら ¹⁴⁾の方法を改変して行った。

(1) 試薬の調製

・ 10 mg/ml アスコルビン酸溶液

アスコルビン酸 0.02 g を秤量し、水を 2.0 ml 入れ、溶解させた。

・ BHT 溶液

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を 0.0013g 秤量し、100 ml のエタノールで溶解させ、13 µg/ml BHT 溶液とした。この溶液 10 µl をエタノール 200 µl に加え、BHT 希釈液とした。

・ 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)

1156 µl の 17.3 M 酢酸に水を加えて 200 ml にメスアップし、0.1 M 酢酸を調製した。8.2 g の酢酸ナトリウムを水に溶解して 100 ml にし、0.1 M 酢酸ナトリウム溶液を調製した。pH 4.5 となるように 0.1 M 酢酸と 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液を混合し、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を調製した。

・ 10,000 U/ml β - グルクロニダーゼ溶液

まず 100,000 U/ml となるように β - グルクロニダーゼ粉末 (大腸菌製, 1,130,000 U/g solid, 25 KU) 0.0130 g (14,690 U) を 1469 µl の 50%グリセロールに溶解した。使用時には、この溶液を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で 10 倍希釈したものをを用い、この希釈は用事調製とした。

(2) 標準溶液の調製

・ α-CEHC 標準溶液

20 µg/ml となるように α-CEHC (MW 278.3) を BHT 希釈液に溶解し、α-CEHC 標準溶液とした。BHT 希釈液を対照として、この標準溶液の吸光度 (291 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{291 \text{ nm}} = 3276$ より正確な濃度を求めた。これを 10 倍希釈したものを、HPLC 用標準液とした。

・ γ-CEHC 標準溶液

20 µg/ml となるように γ-CEHC (MW 264.3) を BHT 希釈液に溶解し、γ-CEHC 標準溶液とした。BHT 希釈液を対照として、この標準溶液の吸光度 (297 nm) を測定し、分子吸光係数 $\epsilon_{297 \text{ nm}} = 3626$ より正確な濃度を求めた。これを 10 倍希釈したものを、HPLC 用標準液とした。

(3) 抽出

尿 1 ml を共栓試験管にとり、10 mg/ml アスコルビン酸を 100 µl 加え、混合した。次に BHT 希釈液を 20 µl 入れ、混合した。10,000 U/ml β - グルクロニダーゼ溶液 (用事調製) を 100 µl 入れ混合した後、試験管をキャップで密栓し、37°C で 4 時間インキュベーションさせた。6 M 塩酸 50 µl を加えて酵素反応を停止した後、ジエチルエーテル 2 ml を加え、ローリングミキサーで 2 分間激しく振とうした。2500 × g で 10 分間遠心分離し、エーテル層 1.0 ml を 1.5 ml チューブに入れた。遠心型エバポレーターで約 30 分間回し、エーテル層を乾固物にした。エタノール 100 µl を加え、管壁に残存する乾固物を完全に溶解し、この溶液を以下の条件の HPLC-ECD に供した。

(4) HPLC 条件

ポンプ : LC-9A (島津製作所)

オートインジェクター

: AS-200 (島津製作所)

カラム : TSKgel ODS 80-TS
(φ4.6 × 250 mm)

カラム温度 : 常温

試料導入装置内温度

: 常温

移動相 : 50 mM NaClO₄ ・ 0.5 mM EDTA-2Na ・ 32.5%アセトニ

トリル・67.5%水 (pH 3.6)
流速 : 1.0 ml/min
検出器 : ECD SI-2 (資生堂社製)
印加電圧 : 550 mV
試料注入量 : 20 μ l

(5) 計算方法

α -CEHC 標準溶液 20 μ l を HPLC に供し、得られた面積から 1 pmol 当りの面積を求めた。測定試料を HPLC に供し、得られた面積と下記の計算式を用いて、尿中排泄量を求めた。

$$\begin{aligned} & \text{尿中 CEHC 排泄量 } (\mu\text{mol/day}) \\ &= \text{測定試料の面積} / (1 \text{ pmol 当りの CEHC} \\ & \text{面積}) \times (2000 \mu\text{l} \times 1000 \mu\text{l}) \times (200 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l}) \\ & / 1 \text{ 日尿量 (ml)} \end{aligned}$$

4. 統計処理

各週の血清中トコフェロール濃度および尿中 CEHC 排泄量の比較には、繰返しのある一元配置分散分析法 (ANOVA) 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. 結果および考察

血清 α -トコフェロール濃度は α -トコフェロール摂取量の増加に伴って増加し、 γ -トコフェロール濃度は減少した (図 1)。 α -トコフェロールの主要な代謝物である α -CEHC の尿中排泄量は、 α -トコフェロール摂取量の増加に伴って増加した (図 2)。尿中 γ -CEHC 排泄量には α -トコフェロール摂取による影響は認められなかった。

10 名中 8 名は 54 mg の α -トコフェロール付加によって 27 mg 付加時よりも血清中 α -

トコフェロール濃度が増加したが、2 名についてはこの α -トコフェロール濃度の増加が認められなかった。ヒト血漿中の α -トコフェロール濃度には飽和点があり、食事 (経口摂取) からそれ以上の α -トコフェロールを摂取しても、 α -CEHC に代謝して尿中に排泄してしまうことが報告されている³⁾。飽和点に達する摂取量は、 α -トコフェロール摂取として 50~150 mg/day とされ、これは血漿中 α -トコフェロール濃度 30~50 μ mol/l に相当する。先の 2 名は 54 mg の α -トコフェロール付加によって尿中 α -CEHC 排泄量が著しく増加したと併せると、 α -トコフェロールが体内飽和したために血清中 α -トコフェロール濃度が一定以上には増加しなかった可能性が考えられる。

Eichhorn ら¹⁵⁾も 38 人に対して α -トコフェロールを 15, 100, 200, 400 mg と 1 週間ごとに段階的に摂取量を増加させ、血中トコフェロールとその尿中代謝物の測定した。血漿中 α -トコフェロール濃度は投与量に依存して増加し、 γ -トコフェロール濃度は減少した。一方、 α -CEHC は摂取量依存的に増加したが、 γ -CEHC は摂取量の多寡にかかわらず変化は無かった。本研究においても、血清 α -、 γ -トコフェロール濃度、その尿中代謝物排泄量の変動は、Eichhorn ら¹⁵⁾の報告と一致するものであった。

以上より、血清中 α -トコフェロール濃度および尿中 α -CEHC 排泄量は摂取量依存的に増加した。特に、54 mg の α -トコフェロールを付加したときの尿中 α -CEHC 排泄量は付加しなかったときの 3.6 倍に増加し、これは血清中 α -トコフェロール濃度の 1.4 倍の増加よりも大きいものであった。このことは、尿中 α -CEHC 排泄量の測定によってビタミン

E の栄養評価を行うことができる可能性を示すものである。今後、自由に生活する人々を対象としたビタミンE摂取量と尿中 α -CEHC排泄量との関係が明らかになることが期待される。

D. 健康危機情報

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. Keller J, Lososky MS. The absorption of alpha-tocopherol in man. *Br J Nutr* (1970) 24, 1033-47.

2. Blomstrand R, Forsgen L. Labelled tocopherols in man. Intestinal absorption and thoracic-duct lymph transport of dl-alpha-tocopheryl-3,4-¹⁴C₂ acetate dl-alpha-tocopheramine-3,4-¹⁴C₂ dl-alpha-tocopherol-(5-methyl-3H) and N-(methyl-3H)-dl-gamma-tocopheramine. *Int Z Vitaminforsch* (1968) 38, 328-44.

3. Schultz M, Leist M, Petrzika M, Gassmann B, Brigelius-Flohe R. Novel urinary metabolite of α -tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? *Am J Clin Nutr* (1995) 62, 1527-34.

4. JE Swanson, RN Ben, GW Burton, RS Parker. Urinary excretion of 2,7,8-trimethyl-2-(β -carboxyethyl)-6-hydroxychroman is a major route of Elimination of γ -tocopherol in humans. *J Lipid Res* (1999) 40, 665-71.

5. Chiku S, Hamamura K, Nakamura T. Novel urinary metabolite of d- α -tocopherol in rats. *J Lipid Res* (1984) 25, 40-8.

6. 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.

7. Yoshikawa S, Morinobu T, Hamamura K, Hirahara F, Iwamoto T, Tamai H. The effect of γ -tocopherol administration on α -tocopherol levels and metabolism in humans. *Eur J Clin Nutr* (2005) 59, 900-5.

8. Jiang Q, Elson-schwab I, Courtemanche C Ames BN. γ -tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macro-phages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97, 11494-9.

9. Cooney RV, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Pigott V, Custer LJ, Mordan LJ. γ -tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to α -tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90, 1771-5.

10. 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—五訂日本食

品標準成分表—大蔵印刷局, 東京, 2000.

11. 玉井浩. 血漿中ビタミンEの測定. *臨床検査* (2001) 45,1083-1087.
12. 阿部浩一, 勝井語一郎. 血清中のトコフェロール同属体の高速液体クロマトグラフィによる定量. *ビタミン* (1975) 49,259-263.
13. Lodge JK, Traber MG, Elsner A, Brigelius-Flohe R. A rapid method for the excretion and determination of vitamin E metabolites in human urine. *J Lipid Res* (2000) 41, 148-54.
14. Stahl W, Graf P, Brigelius-Flohe R, Wechter W, Sies H. Quantification of the alpha- and gamma-tocopherol metabolites 2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman and 2,7,8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman in human serum. *Anal Biochem* (1999) 275, 254-9.
15. Eichhorn J, Lee R, Dunster C, Basu S, Kelly FJ. Alpha- and gamma-tocopherol plasma and urinary biokinetics following alpha-tocopherol supplementation. *Ann NY Acad Sci* (2004) 1031, 339-40.

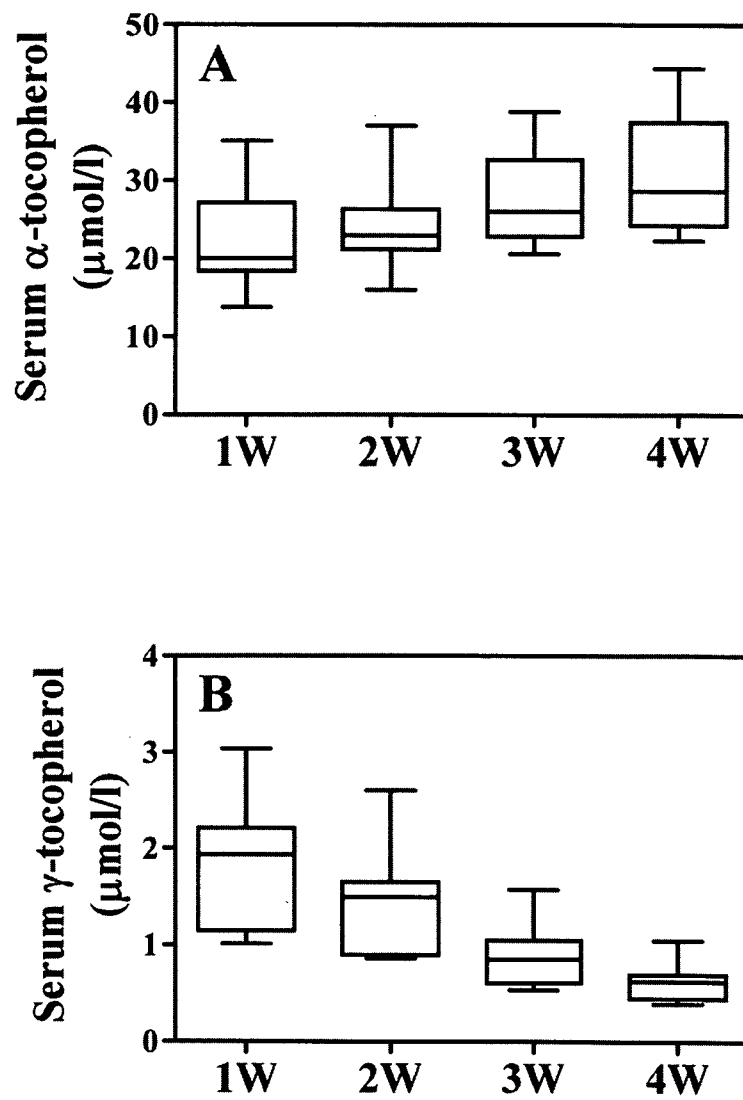


図 1. α-トコフェロール摂取による血清中 α-トコフェロール濃度 (A) および血清中 γ-トコフェロール濃度 (B) の変動. 値は最大値, 第 1 四分点, 中央値, 第 3 四分点, 最小値を表した.

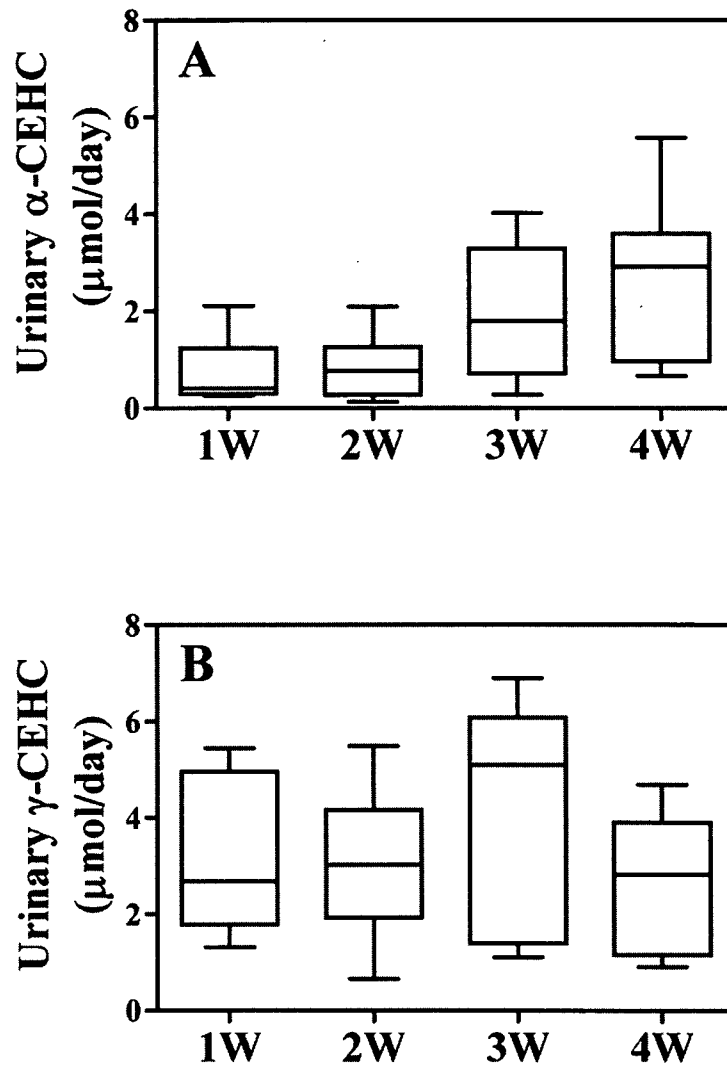


図2. α -トコフェロール摂取による尿中 α -CEHC 排泄量 (A) および尿中 γ -CEHC 排泄量 (B) の変動. 値は最大値, 第1四分点, 中央値, 第3四分点, 最小値を表した.

平成 19 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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

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

7. 高齢者における尿中トコフェロール代謝産物排泄量

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

わが国における高齢者のビタミンE体内動態を知ることが目的として、72.7±2.9歳の高齢者47名を対象とし、1日尿中のトコフェロール代謝産物排泄量を測定した。α-トコフェロール尿中代謝物である2,5,7,8-テトラメチル-2(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン(α-CEHC)の24時間尿中排泄量の平均±標準偏差は0.74±0.59 μmol/dayであり、γ-トコフェロールの尿中代謝物である2,7,8-トリメチル-2(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン(γ-CEHC)の尿中排泄量は4.14±2.64 μmol/dayであった。これらの値は、若年成人男性と同じレベルであった。尿中排泄量の値から判断すれば、加齢に伴う吸収や利用の低下はビタミンEに関しては考慮する必要のないことが推察された。

A. 目的

老化に伴い活性酸素が増加することが多くの研究により報告されている。酸化ストレスから生体を防御する抗酸化物質の一つとして、ビタミンEの重要性が指摘されている。しかしながら、加齢に伴いビタミンの吸収や利用が低下する、というような報告はない。このことより、日本人の食事摂取基準 (2005年度版) においては、高齢者も成人と同様に平成13年国民健康・栄養調査¹⁾の中央値より目安量を算出しており、付加量などは設けられていない²⁾。また、高齢者の尿中のトコフェロール代謝産物を測定したという報告はまだない。そこで、本研究では、高齢者を対象とし、尿中のトコフェロール代謝産物を測定し、その体内動態を検討した。

B. 方法

1. 調査対象

滋賀県立大学倫理委員会の承認を得た上で、本研究の主旨について説明を行い、同意の得られた者を対象とした。対象者47人、平均年齢±標準偏差は72.7 ± 2.9歳であり、高齢ではあるが、食事摂取に問題はなく、自立した生活を行える集団であった。

2. 尿採取

調査日の起床直後の尿は捨て、第2回目の尿から翌日起床直後の第1回目の尿までを遮光ボトルに集め1日尿とした。尿量を測定した後、分注し、分析まで-20°Cで冷凍保存した。

3. 分析

尿中トコフェロール代謝物である2,5,7,8-テトラメチル-2(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン (α -CEHC) および2,7,8-トリメチル-2(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン (γ -CEHC)

の測定は、Yoshikawaら³⁾、Lodgeら⁴⁾、Stahlら⁵⁾の方法を改変して行った。すなわち、尿中のCEHCを β -グルクロニダーゼ処理したのち、エーテル抽出し、HPLCによる分析に供した。HPLCシステムの分析条件については、下記に示す通りである。

ポンプ : LC-9A (島津製作所)

オートインジェクター

: AS-200 (島津製作所)

カラム : TSKgel ODS 80-TS
(ϕ 4.6 × 250 mm)

カラム温度 : 常温

試料導入装置内温度

: 常温

移動相 : 50 mM NaClO₄ · 0.5 mM

EDTA-2Na · 32.5%アセトニ
トリル · 67.5%水 (pH 3.6)

流速 : 1.0 ml/min

検出器 : ECD (SI-2; 資生堂社製)

印加電圧 : 550 mV

試料注入量 : 20 μ l

C. 結果および考察

高齢者47名における1日尿中に排泄されたトコフェロール代謝物の分布を図1に示した。尿中 α -CEHC排泄量の平均±標準偏差は0.74 ± 0.59 μ mol/day、尿中 γ -CEHC排泄量は4.14 ± 2.64 μ mol/dayであった。

若年成人男性 (平均年齢29.3 ± 3.4歳) の尿中には α -CEHCは約0.75 μ mol/day、 γ -CEHCは約4 μ mol/day排泄されることが報告されている³⁾。また、栄養素量が日本人の食事摂取基準 (2005年版)²⁾に記載された推奨量にほぼ等しい規定食を摂取した19~55歳の男性10名の1日尿には、 α -CEHCは0.73 ± 0.62 μ mol/day、 γ -CEHCは3.15 ± 1.50 μ mol/dayが

排泄された⁶⁾。本研究で得られた高齢者の α -CEHCの尿中排泄量は0.74 $\mu\text{mol/day}$ 、 γ -CEHCでは4.14 $\mu\text{mol/day}$ と、これまでに報告された若年成人の値と比較して差異は認められなかった。これらの尿中排泄量の値から判断すれば、ビタミンEに関しては、加齢に伴って吸収や利用は低下しない可能性が考えられた。

Swansonら⁷⁾は、食事から摂取した γ -トコフェロールの約50%が γ -CEHCとして尿中に排泄されると報告している。この報告に従うと、本研究において、高齢者の1日尿には4.14 $\mu\text{mol/day}$ の γ -CEHCが排泄されたことから、約8.3 μmol すなわち約3.5 mgの γ -トコフェロールを被験者は摂取したことになる。しかし、今回は実際に食事から摂取されたビタミンE量は分からなかったため、この値が実際に摂取した量に近似していたかを比較し、明らかにすることは出来なかった。

以上より、本研究において、高齢者の尿中トコフェロール代謝産物排泄量は健常な一般成人と同レベルであることが示された。ビタミンEに関しては、加齢に伴って吸収や利用が低下しない可能性が考えられた。

D. 健康危機情報

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. 厚生労働省. 平成13年国民栄養調査結果. 東京. 2003.
2. 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.
3. Yoshikawa S, Morinobu T, Hamamura K, Hirahara F, Iwamoto T, Tamai H. The effect of γ -tocopherol administration on α -tocopherol levels and metabolism in humans. *Eur J Clin Nutr* (2005) 59, 900-5.
4. Lodge JK, Traber MG, Elsner A, Brigelius-Flohe R. A rapid method for the excretion and determination of vitamin E metabolites in human urine. *J Lipid Res* (2000) 41, 148-54.
5. Stahl W, Graf P, Brigelius-Flohe R, Wechter W, Sies H. Quantification of the alpha- and gamma-tocopherol metabolites 2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman and 2,7,8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman in human serum. *Anal Biochem* (1999) 275, 254-9.
6. 柴田克己, 平成19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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究-微量栄養素と多量栄養素摂取量

のバランスの解明一，平成 19 年度総括・
分担研究報告書. 2008.

7. Swanson JE, Ben RN, Burton GW, Parker RS. Urinary excretion of 2,7, 8-trimethyl-2-(β -carboxyethyl)-6-hydroxychroman is a major route of elimination of γ -tocopherol in humans. *J Lipid Res* (1999) 40, 665-71.

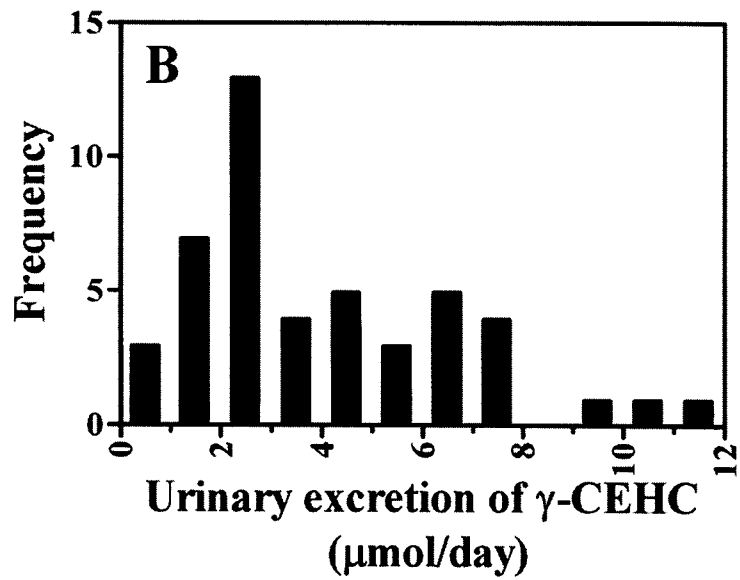
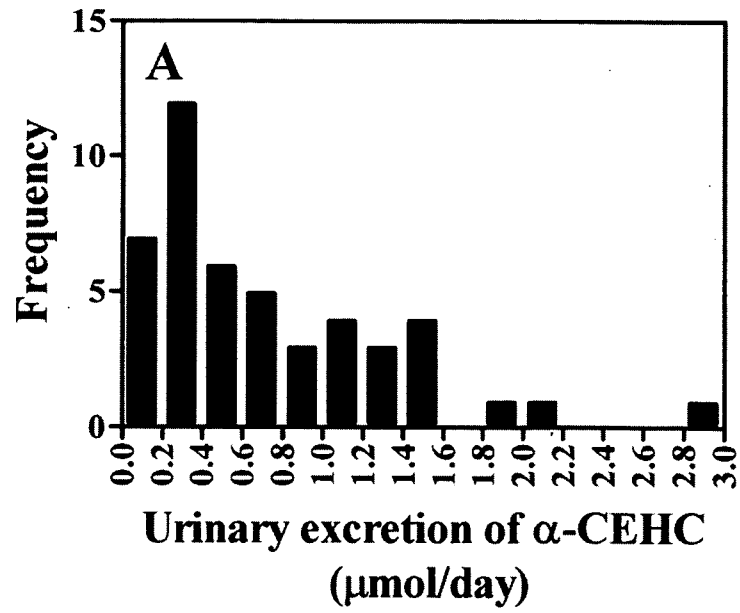


図1. 高齢者における尿中 α -CEHC 排泄量 (A) および尿中 γ -CEHC 排泄量 (B) の度数分布図

平成 19 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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明－

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

8. 年齢によるヒト尿量の違い

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

健康な状態での身体の水分量はほぼ一定に保たれ、動的平衡を維持している。一般に、ヒトが排泄する尿量は 1 日当り 1500 ml とされているが、これに科学的根拠は乏しい。本研究では、健康なヒトが 1 日に排泄する尿量について調べた。その結果、小学生では 671 ± 223 ml/day, 大学生で 823 ± 341 ml/day, 高齢者では 1731 ± 610 ml/day であった。

A. 目的

健康な状態での身体の水分量はほぼ一定に保たれ、動的平衡を維持している。一般に、ヒトが排泄する尿量は1日当り 1500 ml とされているが、この科学的根拠は乏しい。そこで、本研究では、小学生、大学生、高齢者を対象として、健康なヒトが1日に排泄する尿量について調べた。

B. 実験方法

1. 被験者

滋賀県立大学倫理委員会の承認を得た上で、小学生、大学生、高齢者に本研究の主旨について説明を行い、同意の得られた者が本研究に参加した。24時間尿の採尿もれがないこと、クレアチニン (mg/d) / 体重 (kg) 比が 10.8 以上 25.2 以下であることを満たす者を調査対象とした。調査対象となった小学生 59 名の平均年齢 ± 標準誤差は 10.9 ± 0.8 歳、平均身長 143.7 ± 7.5 cm、平均体重 35.6 ± 6.8 kg であった。大学生 79 名の平均年齢は 20.6 ± 0.7 歳、平均身長 160.8 ± 7.5 cm、平均体重 55.3 ± 8.4 kg であった。高齢者 39 名の平均年齢は 72.5 ± 2.9 歳、平均身長 161.3 ± 6.7 cm、平均体重 59.6 ± 9.6 kg であった。

2. 採尿

調査日の起床直後の尿は捨て、第2回目の尿から翌日起床直後の第1回目の尿までを遮光のボトルに集め、1日尿とした。尿量を測定した後、分注し、分析まで -20°C で冷凍保存した。

3. 尿中クレアチニン排泄量の分析
分析の詳細は II-21 に示した。

C. 結果と考察

本研究では、より精度の高い尿を用いた解

析を行うために、尿の取り忘れの有無、クレアチニン排泄比の一つでも満たさなかったサンプルについては、解析対象から除外した。これにより、精度の高い解析を行うことができた。

結果健康なヒトの1日尿量は、小学生で 671 ± 223 ml/day、大学生で 823 ± 341 ml/day、高齢者で 1731 ± 610 ml/day であった (図 1)。高齢者の1日尿量は小学生および大学生に比して 2~3 倍と多いものであった。

また体重当たりで求めた場合、その概数は、小学生で 18.8 ml/kg、大学生で 14.9 ml/kg、高齢者で、29.0 ml/kg となり高齢者の値が非常に高かった。

D. 健康危機情報

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

なし

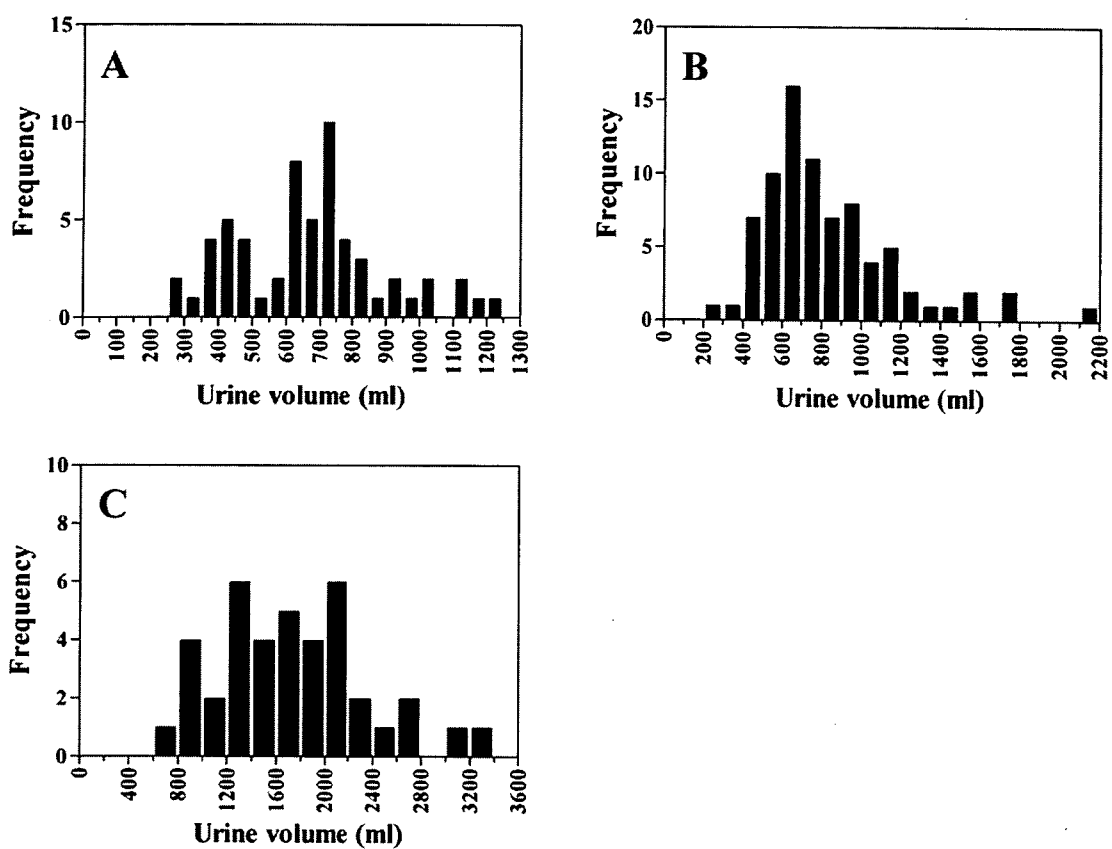


図1. 小学生 (A), 大学生 (B), 高齢者 (C) における1日尿の尿量の分布