

II. 主任研究者の報告書

9. 紫外線が葉酸含量におよぼす影響

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

柴田研究室で 2002 年に行った、男女大学生を被験者としたビタミン必要量に関する介入実験では、健康な男女大学生それぞれ 10 名に 7 日間、当時の栄養所要量に基づいた葉酸をプテロイルモノグルタミン酸の形で含む精製食を摂取してもらい、定期的な運動を含み規則正しい生活を続け、8 日目の朝に採血を行った。女性は冬に、男性は夏に実験が行われた。この結果、男性の血清中葉酸値は 15.6 ± 4.6 pmol/ml (平均値 \pm 標準偏差) で、女性の血清中葉酸値 30.2 ± 8.6 pmol/ml に比べ有意に低値であった。また、2004 年には、日常食を自由摂取した、サプリメントからのビタミン摂取のない健康な男女大学生（男性 23 名、女性 32 名）の血中水溶性ビタミン濃度を調査した実験では男性の血清中葉酸値は 15.0 ± 5.8 pmol/ml、女性は 17.7 ± 5.9 pmol/ml であり、男女の血清中葉酸値に性差はみられなかった。このことから、2002 年の介入実験では、男性が夏にランニング・短パンといった露出の多い格好で野外で活動することが多かったことで、紫外線を多く浴び、血清中の葉酸が壊されたのではないかと考えられた。

紫外線が生体中の葉酸を破壊するのか、また、紫外線曝露の多い人に対して葉酸付加の必要性があるのか検討するため、ヒトを被験者とした *in vivo* の実験、*in vitro* での葉酸標準溶液、ヒト血液を用いた実験を行った結果、紫外線は血中のプテロイルモノグルタミン酸を破壊する可能性が示唆された。プテロイルモノグルタミン酸としての葉酸摂取量の増加は、血中葉酸化合物の割合を変化させ、プテロイルモノグルタミン酸濃度を増加させる可能性があるため、今後は葉酸付加の必要性に加え、その摂取形態についての検討も必要であると考えられる。

A. 目的

我々は 2002 年に行った男女大学生を被験者としたビタミン必要量に関する介入実験を行った¹⁾。実験では健康な男女大学生それぞれ 10 名に 7 日間、当時の栄養所要量に基づいた、葉酸をプテロイルモノグルタミン酸の形で含む完全栄養食を摂取させ、定期的な運動を含めた規則正しい生活をしてもらい、8 日目の朝に採血を行った。女性は 3 月 1 日から 3 月 8 日にかけて、男性は 8 月 27 日から 9 月 3 日にかけて実験を行った。この結果、男性の血清中葉酸値は 15.6 ± 4.6 pmol/ml (平均値 \pm 標準偏差) で、女性の血清中葉酸値 30.2 ± 8.6 pmol/ml に比べ有意に低値であった。また、2004 年に行った日常食を摂取したときの健康な男女大学生 (男性 32 名、女性 23 名) の血清中葉酸値を調査した実験では、男性の血清中葉酸値は 15.0 ± 5.8 pmol/ml、女性は 17.7 ± 5.9 pmol/ml であり、男女の血清中葉酸値に有意差はみられず、葉酸の血清中濃度には性差はないと考えられた。このことから、2002 年の実験で、男女の血清中葉酸値に有意差がみられたのは、男性は実験の休憩時間に、ランニング・短パンといった露出の多い格好で夏場の強い紫外線に曝され、野外で活動することが多かったことで、血清中の葉酸が破壊されたのではないかと考えられた。

葉酸 (プテロイルモノグルタミン酸) は光に対して不安定であり、実際に紫外線照射による破壊が起こるといことはいくつかの論文で報告されている^{2,3,4,5)}。それらは *in vitro* の実験であり、光分解産物の同定を主たる目的としているものが多い。また、*in vitro* で血清あるいは血漿に直接紫外線を照射し、葉酸が破壊されたという報告^{6,7)}や、*in vivo* の実験で UVA 曝露した被験者の血清中葉酸値に変

化はなかったという報告⁸⁾もあり、実際に紫外線が生体中の葉酸に与える影響については未だはっきりとした結論は出されていない。

葉酸欠乏は、巨赤芽球貧血や動脈硬化、我が国でも発症件数の増加が懸念されている二分脊椎・無脳症といった神経管閉鎖障害疾患の発症リスクを増加させる⁹⁾。もし、紫外線が生体中の葉酸を破壊するのであれば、これらの発症リスクを低減するためにも破壊量に見合った量を補給することが必要となる。今回は、紫外線が生体中の葉酸を破壊するのか、また、紫外線曝露の多い人に対して葉酸付加の必要性があるのか検討するため、ヒトを被験者とした *in vivo* の実験、*in vitro* での葉酸標準溶液、ヒト血液を用いた実験を行った。

B. 実験方法

第一実験 (ヒトにおける紫外線曝露実験)

1. 被験者

22 歳から 32 歳 (平均 22 歳) の健康な女性 15 名、19 歳から 36 歳 (平均 24 歳) の健康な男性 10 名。

身長、体重などの詳細は表 1 に示した。

2. 実験方法

実験日: 2007 年 8 月 6 日 (月) ~ 8 月 8 日 (水) のうち 2 日間

天候: 両日共に晴れ

方法: 3 日間のうち、被験者全員が日光浴をする日/しない日の両方があたるようにランダムに、日光浴をする“外グループ”、室内で過ごす“中グループ”に分けた。両グループとも、採血 (採血 1) の後、1 日のうちで最も紫外線の多い時間帯 (11 時~13 時) に屋

外で日光浴もしくは屋内で安静に過ごし、その後再び採血を行った(採血2)。1回目の採血と2回目の採血の血漿中葉酸濃度を測定し、値を比較した。血漿中葉酸値の測定は *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物定量法にて行った。

*食事について…実験前の食事は制限しなかったが、サプリメント等の服用は実施1週間前から中止とし、当日の朝食の時間は7:00から7:30の間とした。実験中はミネラルウォーターのみ自由摂取とした。

*運動について…日光浴以外の影響を避けるために、運動はせず、両グループとも安静に過ごした。

*被験者の服装…外グループはタンクトップ、脚が出る丈のスカートかパンツを着用、中グループは自由とした。

*紫外線積算量

2時間の紫外線積算量を紫外線強度計(UM-10受光部:UM-250,360 MINOLTA)を用いて積算量を測定すると、波長360 nm(UVA)で平均19000 mJ/cm²、波長280~320 nm(UVB) : で平均2200 mJ/cm²であった。

3. 測定

葉酸の定量法はII-21参照。

第二実験(プテロイルモノグルタミン酸標準溶液におけるUVA照射実験)

1. 実験方法

マイクロプレート(SUMILON MULTI WELL PLATE MS-8496F 0.4mL×96Wells Flatbottom)に426 μMの葉酸(プテロイルモノグルタミン酸)溶液を200 μlずつ入れ、紫外線ランプ(365 nm)を照射した。照射は0, 30, 60, 120分間行った。ランプからマイクロプレートの距

離は11 cmとし、紫外線強度計(UM-10受光部:UM-360 MINOLTA)を用いて積算量を測定し、120分でのUVA積算量は3,200 mJ/cm²であった。プテロイルモノグルタミン酸含量の測定は *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物定量法とHPLC法にて行った。

2. 測定

測定はHPLC法、Bioassay法にて行った。Bioassay法についてはII-21参照。HPLC法は以下の測定条件で行った。サンプルは20 μlインジェクトした。

<HPLC測定条件>

カラム: SHISEIDO SUPERIOREX ODS
i.d.4.6 mm×250 mm

カラム温度: 40℃

流速: 1.0 ml/min

検出器: UV DETECTOR SPD-10Avp

検出方法: 280 nm

オートインジェクター: SIL-10AD

STOP TIME: 28 min

プロセッサー: C-R8A

STOP TIME: 27 min

カラムオープン: CTO-10A

ポンプ: LC-10AD

移動相: {5mM Sodium Hexanesulfonate , 20mM H₃PO₄} : アセトニトリル = 9 : 1

第三実験(5-メチルテトラヒドロ葉酸標準溶液におけるUVA, UVB照射実験)

1. 実験方法

マイクロプレート(SUMILON MULTI WELL PLATE MS-8496F 0.4mL×96Wells Flatbottom)に20 μMの5-メチルテトラヒドロ葉酸標準溶液を200 μlずつ入れ、紫外線ランプ(UVA:365 nm, UVB:312 nm)を照射した。照

射は 0, 30, 60, 120 分間行った。ランプからマイクロプレートの距離は UVA ランプで 6 cm, UVB ランプで 9 cm とし, 紫外線強度計 (UVA:UM-10 受光部 : UM-360 MINOLTA, UVB:DRC-100X DIGITAL RADIOMETER SPECTROLINE[®]) を用いて積算量を測定し, 120 分での積算量は UVA で 16600 mJ/cm², UVB で 3,600 mJ/cm² であった。5-メチルテトラヒドロ葉酸含量の測定には HPLC を用いた。

2. 測定

HPLC 法にて行った。サンプルは 20 µl インジェクトした。測定条件は第二実験と同様である。

第四実験 (ヒト血液における UVA 照射実験)

1. 被験者 (血液提供者)

日常食を摂取している, サプリメントを服用していない健康な男女 12 名 (男性 4 名, 女性 8 名)

2. 実験方法

シャーレ (SUMILON DISH φ60×15 mm) に EDTA を加えたヒト全血を 3ml ずつ入れ, 紫外線ランプ (365 nm) を照射した。照射は 120 分間行った。ランプからシャーレまでの距離は 4.5 cm とし, 紫外線強度計 (UM-10 受光部 : UM-360 MINOLTA) を用いて積算量を測定し, 120 分での積算量は 7,560 mJ/cm² であった。対照となる未照射血液サンプルは常温で暗所に 120 分間放置した。血液サンプルは遠心分離し, 血漿を得た後, 葉酸含量の測定を行った。測定は *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物定量法にて行った。また, 照射時の血液の蒸発による血中葉酸の濃縮を考慮するため, 照射前後で数値に (光分解による) 変化のない, 血漿中総タンパ

ク質を測定し, 血漿葉酸濃度を総タンパク質 1 mg あたりで割ることで補正し, 数値を比較した。

3. 測定

Bioassay による測定方法は II-21 参照。タンパク質は BioRad Protein Assay により行った。色素である Coomassie[®]ブリリアントブルー G-250 はアルギニンを始めとする塩基性アミノ酸残基や芳香族アミノ酸残基に結合し, これにより, 色素の最大吸収波長が 465 nm から 595 nm に移動する。これを利用して BSA 標準溶液へブリリアントブルーを添加したときの吸光度から検量線を作成し, 未知試料の濃度を求めた。

第五実験 (葉酸化合物添加ヒト血液における UVA 照射実験)

1. 被験者 (血液提供者)

日常食を摂取している, サプリメントを服用していない健康な男女 11 名 (男性 7 名, 女性 4 名)

2. 実験方法

15 ml 容プラスチックチューブ (SUMILON) に EDTA を加えた全血を 6 ml 入れ, そこに本来の血液中葉酸値の倍程度の濃度になるように調整した (約 110 µM) プテロイルモノグルタミン酸標準溶液, 5-メチルテトラヒドロ葉酸標準溶液を 1 ml 加えた。15 ml 管は遮光するためアルミホイルを巻いて使用した。そこから血液 3 ml を取り, シャーレ (SUMILON DISH φ60×15 mm) に入れ, 紫外線ランプ (365 nm) を 120 分間照射した。ランプから紫外線強度計 (UM-10 受光部 : UM-360 MINOLTA) とシャーレまでの距離

は 6.0 cm であり、照度は 2,300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ であった。(積算量は 16,600 mJ/cm^2) 120 分後にサンプルを取り出し、未照射のサンプルとともに血液の処理を行った。対照となる未照射血液サンプルは常温で暗所に 120 分間放置した。血液サンプルは遠心分離し、血漿を得た後、葉酸含量の測定を行った。測定は *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物定量法にて行った。その後、血漿中の測定を行った。照射による血液の濃縮を考慮するため、血漿中総タンパク質を測定し、血漿葉酸濃度を総タンパク質 1 mg あたりで割ることで補正し、数値を比較した。

2. 測定

Bioassay による測定方法は II-21 参照。タンパク質の測定は第四実験を参照。

C. 結果

第一実験 (ヒトにおける紫外線曝露実験)

図 1 に、屋外で紫外線を浴びた被験者のグループと、屋内で安静に過ごした被験者のグループの採血 2 と採血 1 の血漿中葉酸値の差を示した。この 2 グループの数値に有意差がみられなかったことから、血中葉酸含量において紫外線による影響はなかった。

第二実験 (プテロイルモノグルタミン酸標準溶液における UVA 照射実験)

図 2 に、プテロイルモノグルタミン酸に UVA 照射を行ったときの時間毎の残存量を示した。HPLC 法・Bioassay 法ともに UVA 照射 30 分でプテロイルモノグルタミン酸の残存量は約 60% となり、照射 60 分でほぼ破壊された。また、今回の実験により、Bioassay 法で用いた *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773

はプテロイルモノグルタミン酸の光分解産物に活性を示さないということが明らかとなった。

第三実験 (5-メチルテトラヒドロ葉酸標準溶液における UVA, UVB 照射実験)

図 3 に 5-メチルテトラヒドロ葉酸へ UVA / UVB 照射を行ったときの時間毎の残存量を示したが、照射 0, 30, 60, 90, 120 分それぞれの段階で殆ど変化はみられず、5-メチルテトラヒドロ葉酸は太陽光の紫外線を 2 時間照射しても破壊されないということがわかった。

第四実験 (ヒト血液における UVA 照射実験)

図 4 にヒト血液に直接紫外線照射を行ったとき、未照射サンプルと照射サンプルのタンパク質 1 mg あたりで補正した血漿中葉酸値の比較を示した。数値に有意差はなく、夏場の薄曇り程度の紫外線を 2 時間、血液に直接照射しても葉酸は破壊されなかった。

第五実験 (葉酸化合物添加ヒト血液における UVA 照射実験)

図 5 に葉酸化合物を添加したヒト血液に直接紫外線照射を行ったとき、未照射サンプルと照射サンプルのタンパク質 1 mg あたりで補正した血漿中葉酸値の比較を示した。5-メチルテトラヒドロ葉酸添加血液において、タンパク質 1 mg あたりの血漿中葉酸値に変化はみられず、紫外線による影響はなかったが、プテロイルモノグルタミン酸添加血液においてタンパク質 1 mg あたりの血漿中葉酸値は有意に減少した。

D. 考察

本研究では、紫外線は生体中の葉酸を破壊

するのか、また、紫外線曝露の多い人に対し葉酸付加の必要性があるのか検討するため、*in vivo* または *in vitro* での実験を行った。第一実験では、真夏の太陽光への2時間の曝露によって健康な被験者の血漿中葉酸値が減少することはなかった。男女別で検定をしても同じ結果であった。また、本実験において男女の血漿中葉酸値に性差はなかった。2002年の実験と今回の実験との条件を比較すると、2002年実験時の葉酸はプテロイルモノグルタミン酸の形で摂取されていたが、本実験ではサプリメントではなく食事のみから葉酸を摂っていたというところが異なっていた。

葉酸はプテリジン、*p*-アミノ安息香酸、グルタミン酸により構成されており、食品中の葉酸は、グルタミン酸が多数繋がったポリグルタミン酸型である。これらが摂取されると小腸の刷子縁膜に存在するコンジュガーゼにより加水分解され、吸収される。粘膜細胞内ではモノグルタミン酸型として存在し、粘膜上皮細胞で、メチル化された葉酸は、門脈を経て肝臓、そこから全身の組織へと運ばれる。血漿中の葉酸はそのほとんどが5-メチルテトラヒドロ葉酸の形で存在するが^{10,11)}、血清中の葉酸化合物の割合は摂取する葉酸の形態で変化する可能性があるという論文もある¹²⁾。2002年の実験では葉酸はサプリメントとしてプテロイルモノグルタミン酸の形で摂取されていたため、血中にプテロイルモノグルタミン酸が多く移行したのではないかと考えられた。また、第二・三実験より、プテロイルモノグルタミン酸は紫外線により容易に破壊されるが、5-メチルテトラヒドロ葉酸は紫外線により破壊されることはなかった。よって、血中の葉酸化合物のうち、

プテロイルモノグルタミン酸の割合が増加すると、それが紫外線により破壊される可能性があると考えられた。

第四実験では日常食を摂取しているヒトの未照射サンプルと照射サンプルの血漿中葉酸濃度に有意差はなかったが、人為的に血液中の葉酸化合物の割合を変化させた第五実験では、プテロイルモノグルタミン酸添加血液において血漿中葉酸値が有意に減少した。この結果から血中プテロイルモノグルタミン酸の割合が増加すると、それが紫外線によって破壊されるという事が明らかとなった。この結果より、葉酸をプテロイルモノグルタミン酸の形で摂っていても、紫外線による光分解によって破壊され、血中葉酸含量が減少する可能性が出てきたため、葉酸付加の検討については摂取時の葉酸化合物の種類についても検討を加えていく必要があるのではないかと考える。

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

一部、平成19年 日本栄養・食糧学会中四国・近畿支部合同大会(第40回記念中四国支部大会・第46回近畿支部大会)にて口頭発表

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. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohnishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Muratani M, Ihara H and Hashizume N. Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese dietary reference Intake. *J Nutr Sci Vitaminol* (2005) .51: 319-328.
2. Lowry OH, Bessey OA, and Crawford EJ. Photolytic and enzymatic transformations of pteroylglutamic acid. *J boil chem.* (1949) 180, 389-398
3. Off M K, Steindal A E, Porojnicu A C, Juzeniene A, Vorobey A, Johnsson A, Moan, J. Ultraviolet photodegradation of folic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2005) 80 (1) ,47-55
4. Akhtar MJ, Khan MA, Ahmad I. Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *J Pharm Biomed Anal.* (1999) 19(3-4),269-75.
5. Jamil Akhtar M, Ataulah Khan M, Ahmad I. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution. *J Pharm Biomed Anal.* (2003) 10;31(3),579-88.
6. Branda R F, Eaton J W. Skin color and nutrient photolysis: An evolutionary hypothesis. *Science* (1978) 201, 625-626.
7. Der-Petrossian M, Föding M, Knobler R, Höningmann H, Trautinger F. Photodegradation of folic acid during extracorporeal photopheresis. *British Journal of Dermatology.* (2007) 156 (1) ,117-121
8. Gambichler T, Bader A, Sanuermann K, Altmeter P, and Hoffmann K. Serum folate levels after UVA exposure: a two-group parallel randomized controlled trial. *BMC Dermatol.* (2001) 1,8.
9. 「神経間閉鎖障害の発祥リスク提言のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について」, 児母第 72 号, 健医地正発第 78 号, 平成 12 年 12 月 28 日, 厚生省自動家庭局母子保健課長, 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長.
10. ヒューマンニュートリションー基礎・食事・臨床ー医歯薬出版.
11. ビタミンの辞典. 朝倉書店.
12. Determination of folate vitamers in human serum by stable –isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. *Clinical Chemistry* (2004) 50 (2), 423-432.

表 1.被験者の年齢と体格の平均値±標準偏差

	年齢 (歳)	身長 (cm)	体重 (kg)	BMI	体脂肪 (%)
男性 (n = 10)	22.4±2.3	160.2±4.0	52.6±3.3	20.5±1.2	24.0±2.5
女性 (n = 15)	23.5±5.1	171.3±5.9	64.0±9.6	21.8±2.9	18.3±6.0

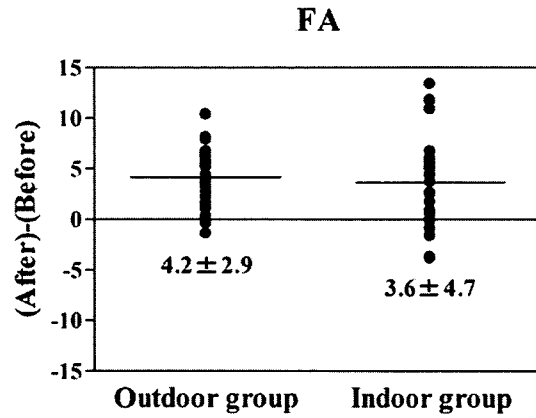


図 1. 紫外線が生体中の血中葉酸濃度におよぼす影響

縦軸は第一実験の採血 2 と採血 1 の血漿中葉酸値の差を、横軸は日光浴をした外グループ、室内で安静に過ごした中グループを示した。グラフ上の数値は平均値±標準偏差であり、Paired *t* test の結果、外グループと中グループの数値に有意差はなかった。

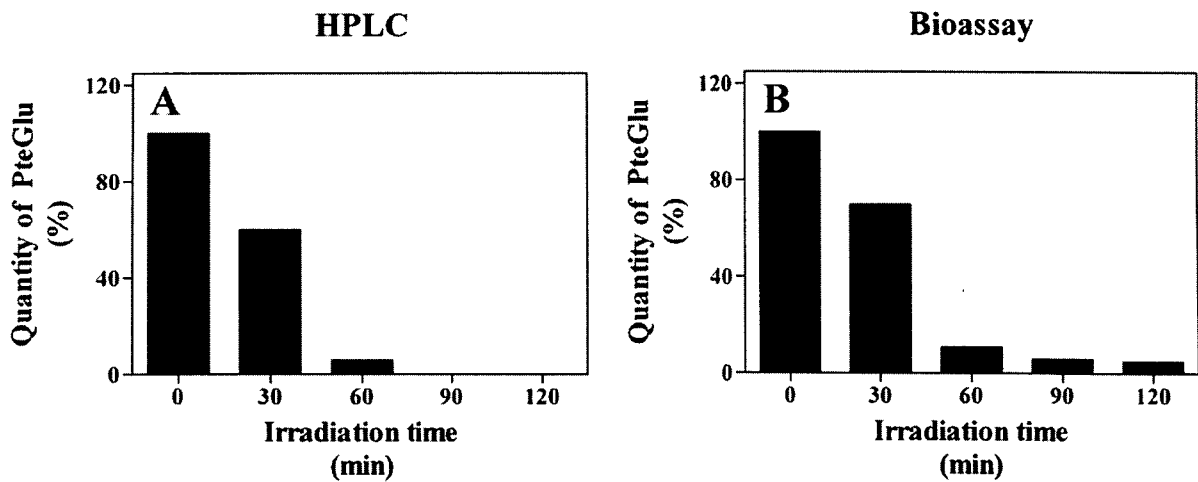


図 2. UVA 照射によるプテロイルモノグルタミン酸標準溶液の破壊

A は HPLC 法、B は Bioassay 法による測定結果である。縦軸はプテロイルモノグルタミン酸の残存量を、横軸は照射時間を示している。照射 0 分のときの残存量を 100%とし、時間毎の経過を示した。

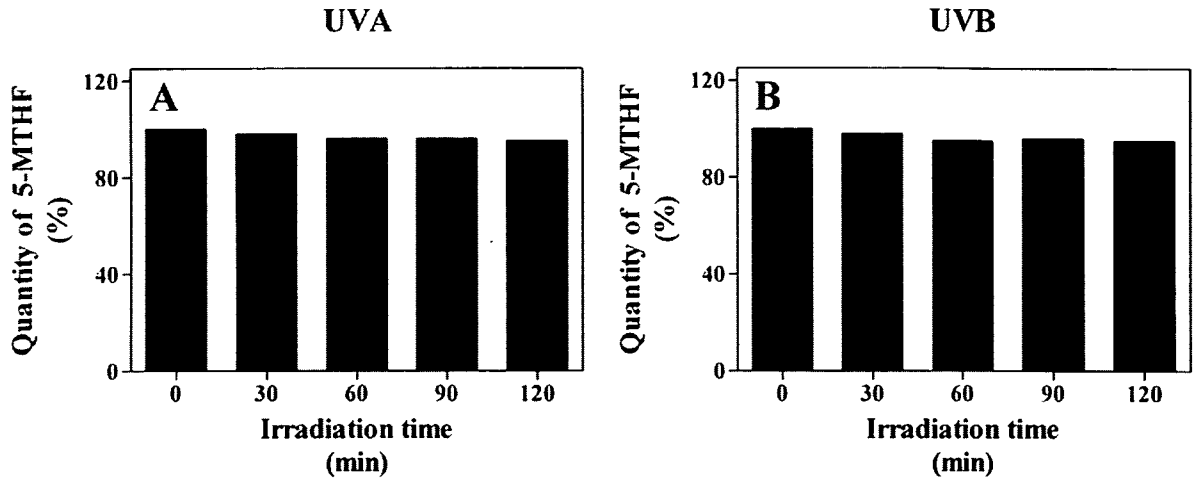


図 3. 5-メチルテトラヒドロ葉酸標準溶液への UVA / UVB 照射

A は UVA, B は UVB 照射の結果である. 縦軸は 5-メチルテトラヒドロ葉酸の残存量を, 横軸は照射時間を示している. 照射 0 分のときの残存量を 100% とし, 時間毎の経過を示した.

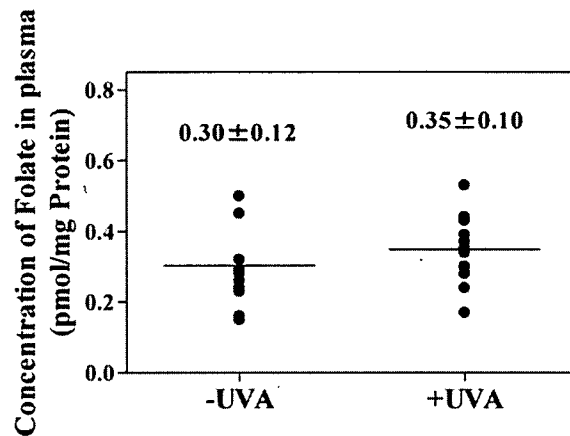


図 4. ヒト血液への UVA 照射が血中葉酸濃度におよぼす影響

縦軸にはタンパク質 1mg で補正した血漿中葉酸濃度を, 横軸には未照射, 照射を示している. 数値は平均値 ± 標準偏差であり, Paired *t* test の結果, 未照射サンプル, 照射サンプルの間に有意差はなかった.

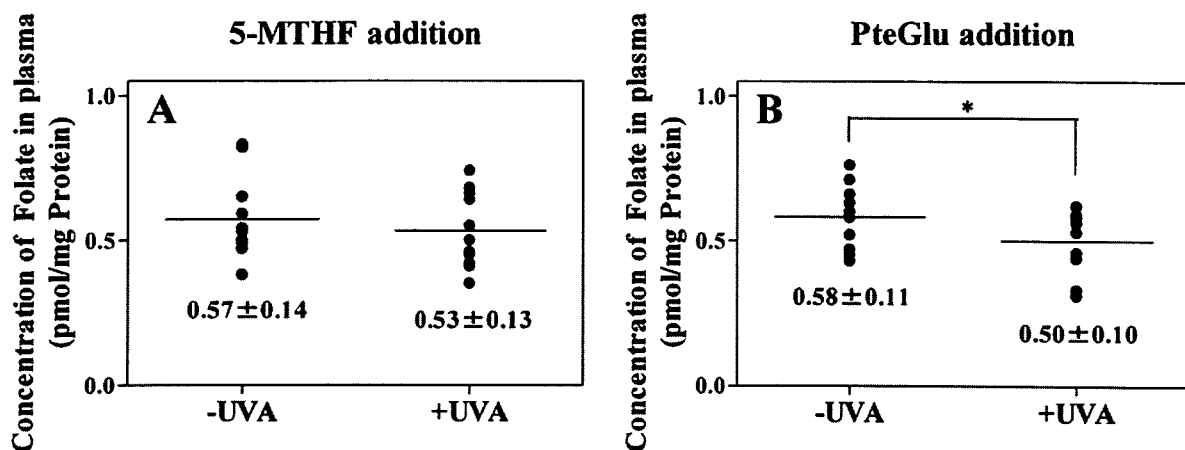


図 5. 葉酸化合物添加血液への UVA 照射が血中葉酸含量におよぼす影響 (日常食摂取被験者) 縦軸にはタンパク質 1mg で補正した血漿中葉酸濃度を, 横軸には未照射, 照射を示している. 数値は平均値±標準偏差であり, Paired *t* test の結果, A では未照射サンプル, 照射サンプルの間に有意差はなく, B では未照射サンプル, 照射サンプルの間には有意差がみられた.

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

10. ラットにおける血中水溶性ビタミン濃度

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

ラットの血液中の水溶性ビタミン含量の基準値の構築を目的とし、今まで我々の研究室で測定してきた血中水溶性ビタミン濃度をまとめてみた。本資料に利用したデータは Wistar 系雄ラット、週齢 6~9 週齢で、飼料はビタミン混合 AIN-93VX を 1%を混餌した 20%カゼイン食で 1 週間以上飼育したラットのものを使った。各々のビタミンの平均値と標準誤差は、全血中のビタミン B₁ で 302 ± 12 pmol/ml (n = 19), 全血中のビタミン B₂ で 201 ± 12 pmol/ml (n = 19), 血漿中のビタミン B₆ で 1620 ± 141 pmol/ml (n = 13), 血漿中のビタミン B₁₂ で 4.5 ± 0.5 pmol/ml (n = 13), 全血中の総ニコチンアミドで 124 ± 9 pmol/ml (n = 10), 全血中のパントテン酸で 2.5 ± 0.2 nmol/ml (n = 22), 血漿中の葉酸で 213 ± 10 pmol/ml (n = 15), 血漿中のビオチンで 34 ± 1.6 pmol/ml (n = 15) であった。

A. 目的

尿中の水溶性ビタミン排泄量は環境や食事の変化に伴って鋭敏に変化する。一方、健康体であれば血中ビタミン濃度には変化が現れにくい。そのため、栄養状態の指標、すなわち個々人が有する最高能力を発揮するための栄養素摂取量を提言するための指標としてもっぱら尿を試料として利用してきた。そのため、尿のデータは蓄積され、ヒトにおける尿中の水溶性ビタミンに関しては、暫定値ではあるが基準値が定めることができた¹⁾。しかしながら将来的に疾患モデルラットなどを扱うことを考えると、血中のビタミン濃度の変化も視野に入れる必要がでてきた。しかしながら過去の動物実験における血中の水溶性ビタミンのデータはまとめられていない。本資料は血中の水溶性ビタミン含量の基準値の構築を目的としたものである。

B. 方法

1. データ選別

本資料に利用したデータは Wistar 系雄ラット、週齢 6~9 週齢で、飼料はビタミン混合 AIN-93VX を 1% を混餌した 20% カゼイン食で 1 週間以上飼育したラットのものを使った。飼料の組成は表 1 に示した。

2. 分析方法

血中総チアミン濃度は、チアミン、TMP、TDP、TTP の合計とした。全血にトリクロロ酢酸を加えて除タンパクし、HPLC による分析に供した²⁾。

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、全血に水と

硫酸を加えて熱処理をおこなったのち、トリクロロ酢酸を加え、除タンパクした。遠心分離後の上清を得、この上清をアルカリ条件下で照射し、これを HPLC による分析に供した³⁾。

血清ピリドキサーリン酸 (PLP) 濃度を測定するために、血漿にメタリン酸を加えて除タンパクし、HPLC による分析に供した⁴⁾。

血漿ビタミン B₁₂ 濃度を求めるために、シアニ化カリウム存在下で血漿中のビタミン B₁₂ をシアノコバラミンに変換し、*Lactobacillus leichmanii*, ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法に供した⁵⁾。

血中総ニコチンアミド濃度を求めるために、全血にイソニコチンアミド溶液を加えてオートクレーブし、遠心分離後の上清を得、この上清をアルカリ中でエーテル抽出し、HPLC による分析に供した⁶⁾。

血漿総パントテン酸濃度を測定するために、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に血漿を供した⁷⁾。

血漿葉酸濃度を測定するために、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物学的定量法に血漿を供した⁸⁾。

血漿総ビオチン濃度を測定するために、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に血漿を供した⁹⁾。

C. 結果

血中ビタミン濃度のデータ

各々のビタミンの平均値と標準誤差は、全血中のビタミン B₁ で 302 ± 12 pmol/ml ($n = 19$)、全血中のビタミン B₂ で 201 ± 12 pmol/ml ($n = 19$)、血漿中のビタミン B₆ で 1100 ± 159 pmol/ml ($n = 10$)、血漿中のビタミン B₁₂ で 4.5 ± 0.5 pmol/ml ($n = 13$)、全血中の総ニコチンアミドで 124 ± 9 pmol/ml ($n = 10$)、全血中のパントテ

ン酸で 2.5 ± 0.2 nmol/ml ($n = 22$), 血漿中の葉酸で 213 ± 10 pmol/ml ($n = 15$), 血漿中のビオチンで 34 ± 1.6 pmol/ml ($n = 15$) であった。

D. 考察

ヒトにおける血中水溶性ビタミン濃度の基準値は B₁ で 90 nmol/ml, B₂ で 180 pmol/ml, B₆ で 40 pmol/ml, B₁₂ で 0.5 pmol/ml, 総ニコチンアミドで 50 nmol/ml, パントテン酸で 1.6 nmol/ml, 葉酸で 7 pmol/ml, ビオチンで 6.6 pmol/ml であり^{10, 11, 12)}, 全体的にラットの方が高く, 特に血漿中 B₆ の値はラットの方が 25 倍も高かった。

しかしながら過去の文献においては成熟ラットの血漿中 PLP の値は 755 ± 177 pmol/ml であり¹³⁾, 本研究データの方が 1.5 倍近く高い。このことは定量法の差によるものか, ラットの系統差によるものと考えられる。過去の文献による他の血中ビタミン濃度は B₁ で 917 ± 45 nmol/ml¹⁴⁾, B₂ が 105 pmol/ml¹⁵⁾, B₁₂ で 2.6 ± 0.4 pmol/ml¹⁶⁾, 総ニコチンアミドで 103 ± 6.2 nmol/ml¹⁷⁾, パントテン酸で 2.3 ± 0.4 nmol/ml¹⁸⁾, 葉酸で 127 ± 9.7 pmol/ml¹⁶⁾ で, ビオチンが 22 ± 3.9 pmol/ml¹⁹⁾ であり, B₁ において文献値と本データの値が大きく異なるが, これは定量法がほぼ同じであるため, 系統差, もしくは飼料の違いによるものと考えられる。他のビタミンに関してはほぼ同値であった。

変動係数はビタミン B₁₂ が 44%, パントテン酸では 33% と大きく, パントテン酸ではサンプルによっては検出限界以下であった。これは血中に含まれて入るパントテン酸の量がきわめて少ないことに起因していると考えられる。これらのことから, パン

トテン酸や B₁₂ においてはさらに高感度, 高安定性な測定法の開発が待たれる。同じ条件で飼育したラットでは血中のビタミン濃度の値はほぼ安定しており, ラットを飼育する時期の差や, ラットを購入した時期の違いにおけるロットの差はなく, 実験度動物の品質は安定していることが分かった。しかしながら現段階では過去の実験において積極的に血中ビタミンを測定していなかったこともあり, サンプル数が不足している。今後の動物実験においてサンプル数が増加すればより信憑性のあるデータが得られる。

E. 健康危険情報

特記する情報は無い。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 口頭発表
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 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金循環器疾患棟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. I. 総括研究報告
- 2 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, *食品衛生学雑誌* (2004) 45, 231-8.
 - 3 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) 258, 5623-8.
 - 4 Rybak ME, Pfeiffer CM. Clinical analysis of vitamin B₆: determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem* (2004) 333, 336-44.
 - 5 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, 5177-80.
 - 6 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.
 - 7 Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.
 - 8 Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44, 361-70.
 - 9 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.
 - 10 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 14 年度 総括・分担研究報告書 柴田克己, 平成 15(2003)年 4 月
 - 11 Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Onishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N. Value of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J. Nutru. Sci Vitaminol.*, under contribution.
 - 12 Takeda A, Suyama T, Suzuki T, Imanishi M, Takeda R, Kitamura R, Tamai H, Kimura M. Vitamin B1 nutritional status assessed by blood vitamin B1 value of middle aged Japanese men and woman. *Vitamins* (2002) 76,349-353
 - 13 Ien-lan W. The influence of dietary restriction on vitamin B-6 vitamers and on vitamin B-6 metabolizing enzymes in rats. *J American college of nutrition* (1999) 18, 144-151
 - 14 Kimura M, Fujita T, Itokawa Y.

- Liquid-Chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin Chem* (1982)28, 29-31
- 15 Mahtab S. Bamji, Sharada D. Hepatic glutathione reductase and riboflavin concentration in experimental deficiency of thiamin and riboflavin in rats. *J nutrition* (1971) 102, 443-448
- 16 Lee I, Lee H, Kim J, Chae E. H, Kim S. J, Chang N. Short-term hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress activates retinal glial cell and increase vascular endothelial growth factor expression in rat retina. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2007) 71, 1203-1210
- 17 Shibata K, Matsuo H. Levels of NAD, NADP and their related compounds in rat blood. *帝国学園紀要* (1989) 15, 9-12
- 18 Hatano M, Hodges R.E., Evans T. C., Hagemann R.F., Leeper D. B., Bean W. B., Krehl W. A. *The American Journal of Clinical Nutrition* (1967) 20, 960-967
- 19 Rathman S.C., Gregory J.F., McMahon.R.J. Pharmacological biotin supplementation maintains biotin status and function in rats administered dietary carbamazepine. *The Journal of Nutrition.* (2003) 133, 2857-62

表 1. 100 g 当たりの飼料組成

	(%)
カゼイン	20
L-メチオニン	0.2
α -コーンスターチ	46.9
ショ糖	23.4
コーン油	5
ミネラル混合 (AIN-93M MX)	3.5
ビタミン混合 (AIN93-VX)	1

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

11. ラットにおける水溶性ビタミン尿中排泄量エビデンステーブルの構築

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

我々は尿中水溶性ビタミンの排泄量を健康維持のための栄養指標として利用する研究を行っているおり、日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスを構築するため、様々な条件でラットを飼育し、ラットの尿や血液中の水溶性ビタミンを測定してきた。しかし、ラットにおける水溶性ビタミン尿中排泄量の目安となるデータを網羅的にまとめたものは存在しなかった。よってここでラットにおける水溶性ビタミン尿中排泄量の目安を設定するために我々が過去に行った研究の尿中水溶性ビタミン尿中排泄量のデータを集積、解析した。結果、それぞれの平均値 ± 標準偏差はチアミンで 60.0 ± 30.2 nmol/day, リボフラビンで 123 ± 39.5 nmol/day, ビタミン B₆ で 264 ± 85.7 nmol/day, ビタミン B₁₂ で 50.5 ± 34.8 pmol/day, ナイアシンで 6.59 ± 2.40 μmol/day, パントテン酸で 700 ± 241 nmol/day, 葉酸で 5.27 ± 1.83 nmol/day, ビオチンで 4.75 ± 3.20 nmol/day となった。この結果を用いてラットを使った動物実験で測定した水溶性ビタミンの尿中排泄量の目安を定めることが可能となった。

A. 目的

厚生労働省科学研究費によって行われた研究ではヒトで行う実験の予備実験や、倫理的にヒトで行うことができない実験などではラットを用いて実験を行っている。このことからラットを用いた時の水溶性ビタミン尿中排泄量の目安を設定する必要性がでてきた。よって、本研究ではこれまでに行われてきたラットを使った動物実験で測定した水溶性ビタミンの尿中排泄量をまとめ、最終的には絶対的な基準として定めることが目的である。

B. 方法

厚生労働省科学研究費によって行われた過去6年間におけるラットを用いた研究の各水溶性ビタミンの尿中排泄量のうちコントロール群(ビタミン混合 AIN-93VX 20%カゼイン食)の値と明らかに外れているものを除外し、平均値 ± 標準偏差を算出した。

採尿方法

代謝ケージ (CT-10, 日本クレア株式会社)の尿受けを洗い、三角フラスコに1 M 塩酸を1 ml 入れ、尿受けの下にセットした。24 時間採尿後、尿をメスシリンダーに入れ、0.1 M 塩酸で一定に調整したのち、使用するまで-20°Cで保存した。

水溶性ビタミンの測定方法

チアミン

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¹⁾による HPLC 法を改変した福渡ら²⁾の方法に従って測定した。詳細は II-21 に記載した。

リボフラビン

尿をそのまま測定用試料とした。尿リボフ

ラビンは HPLC 法に従って測定した³⁾。詳細は II-21 に記載した。

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-ピリドキシン酸 (4-PIC) の尿中排泄の測定は HPLC 法に従って測定した。詳細は II-21 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。ビタミン B₁₂ は *lactobacillus leichmannii* 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-21 に記載した。

ナイアシン

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。尿を文献⁶⁾に示した方法により、精製を行った後、HPLC 法に供し、ニコチンアミド、2-Py、4-Py の含量を測定とした。一方、MNA は、蛍光誘導体にしたのち HPLC 法で測定した⁷⁾。詳細は II-21 に記載した。

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 plantrorum* 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-21 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 を用いた微生物学的定量法にて測定した⁹⁾。詳細は II-21 に記載した。

ビオチン

尿をそのまま測定試料とした。尿中のビオチンは *lactobacillus plantrorum* ATCC 8014 を

用いた微生物学的定量法にて測定した^{10,11)}。
詳細はII-21に記載した。

C. 結果

各ビタミンのサンプル数, 平均値 ± 標準偏差は, チアミンで 60.0 ± 30.2 nmol/day (n = 509), リボフラビンで 123 ± 39.5 nmol/day (n = 764), ビタミン B₆ で 264 ± 85.7 nmol/day (n = 514), ビタミン B₁₂ で 50.5 ± 34.8 pmol/day (n = 706), ナイアシンで 6.59 ± 2.40 μmol/day (n = 441), パントテン酸で 700 ± 241 nmol/day (n = 397), 葉酸で 5.27 ± 1.83 nmol/day (n = 551), ビオチンで 4.75 ± 3.20 nmol/day (n = 664) となった。

D. 健康危険情報

特になし

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

H. 引用文献

1. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. Lipoid (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 rivoflavin 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. 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.

7. Shibata K. Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.

8. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.