

表 1. 尿中の水溶性ビタミンの安定化のための処理方法

	尿量	試薬	測定
処理なし	4.5 ml	-	V.B <sub>12</sub> , パントテン酸, ビオチン
塩酸処理	4.5 ml	1 M HCl 0.5 ml	V.B <sub>1</sub> , V.B <sub>2</sub> , VB <sub>6</sub>
メタリン酸処理	2 ml	10%メタリン酸 2 ml	V.C
AsA 処理	4.5 ml	1 M AsA 0.5 ml	葉酸

1. 24 時間尿は、尿をよく攪拌し、尿量を測定した。
2. チューブに尿を 9 ml 程度とった。
3. 0.5 ml の 1 M 塩酸を入れたチューブに尿を 4.5 ml 取り、軽く攪拌した。
4. 2 ml の 10%メタリン酸を入れたチューブに尿を 2 ml 加え、攪拌した。
5. 0.5 ml の 1 M AsA を入れたチューブに尿を 4.5 ml 取り、軽く攪拌した。
6. -20°C で冷凍保存した。

表 2. チアミンの HPLC 分析条件

分析カラム	COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS- II (4.6 mm I.D. × 250 mm、ナカライテスク株式会社)
移動相	0.2 M リン酸二水素ナトリウム / 0.3% アセトニトリル
移動相流速	1.0 ml / min
反応液 1	0.01% フェリシアン化カリウム
反応液 1 の流速	0.5 ml / min
反応液 2	15% 水酸化ナトリウム
反応液 2 の流速	0.5 ml / min
反応コイル	PEEK チューブ (0.5 mm I.D. × 1200 mm)
検出波長	Ex. 375 nm, Em. 450 nm
カラム温度	40°C
反応コイル温度	50°C
試料導入装置内温度	室温
試料注入量	20 μl

表 3. リボフラビンの HPLC 分析条件

分析カラム	TSKgel ODS-80Ts (平均粒子直径, 5 $\mu$ m ; 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, 東ソー株式会社, 東京)
移動相	1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5 / メタノール/水 (7 : 300 : 693, v/v/v)
移動相流速	0.8 ml / min
検出波長	Ex. 445 nm, Em. 530 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	室温
試料注入量	20 $\mu$ l

表 4. 4-PIC の HPLC 分析条件

分析カラム	TSKgel ODS-120A (平均粒子直径, 5 $\mu$ m ; 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, 東ソー株式会社, 東京)
移動相	りん酸緩衝液 pH 2.2 / メタノール (9 : 1, v/v)
移動相流速	1.0 ml / min
検出波長	Ex. 355 nm, Em. 436 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 $\mu$ l

表 5. ライヒマニ保存用培地 (保存用培地 100 ml 中)

酵母エキス	0.85 g	トマトジュース粉末	0.37 mg
ペプトン	0.85 g	ポリソルベート 80	0.10 mg
ブドウ糖	1.10 g	カンテン	1.50 mg
リン酸二水素カリウム	0.20 g		

表 6. ライヒマニ接種用培地 (接種用培地 100 ml 中)

酵母エキス	0.85 g	トマトジュース粉末	0.37 mg
ペプトン	0.85 g	ポリソルベート 80	0.10 mg
ブドウ糖	1.10 g	リン酸二水素カリウム	0.20 mg

表 7. ビタミン B<sub>12</sub> 定量用基礎培地 (基礎培地 2 倍濃度 1 ml 中)

カザミノ酸	15 mg	塩酸ピリドキシン	4 μg
L-シスチン	400 μg	塩酸ピリドキサーール	4 μg
DL-トリプトファン	400 μg	塩酸ピリドキサミン	800 ng
硫酸アデニン	20 μg	葉酸	200 ng
塩酸グアニン	20 μg	リン酸二水素カリウム	1 μg
ウラシル	20 μg	リン酸一水素カリウム	1 mg
キサントシン	20 μg	硫酸マグネシウム	400 μg
塩酸チアミン	1 μg	硫酸第一鉄	20 μg
リボフラビン	1 μg	硫酸マンガン	20 μg
ビオチン	10 ng	L-アスパラギン	200 μg
ニコチン酸	2 μg	ブドウ糖	40 mg
パラアミノ安息香酸	2 μg	酢酸ナトリウム (無水)	20 mg
パントテン酸カルシウム	1 μg	アスコルビン酸	4 mg

表 8. ビタミン B<sub>12</sub> 定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	0.1ng/ml ビタミン B <sub>12</sub> ( $\mu$ l)	1.0ng/ml ビタミン B <sub>12</sub> ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	0.1 M リン酸 カリウム 緩衝液 ( $\mu$ l)	ビタミン B <sub>12</sub> 定量用 2 倍濃度基礎培地 (ml)	Total (ml)
0	0	-	800	200	1	2
1	100	-	700	200	1	2
2	150	-	650	200	1	2
3	200	-	600	200	1	2
4	250	-	550	200	1	2
5	300	-	500	200	1	2
6	350	-	450	200	1	2
7	400	-	400	200	1	2
8	500	-	300	200	1	2
9	-	80	720	200	1	2
10	-	100	700	200	1	2
11	-	120	680	200	1	2
12	-	150	650	200	1	2
13	-	170	630	200	1	2
14	-	200	600	200	1	2
15	-	250	550	200	1	2
16	-	300	500	200	1	2
17	-	350	450	200	1	2
18	-	400	400	200	1	2
19	-	450	350	200	1	2
20	-	500	300	200	1	2
試料	a		800-a	200	1	2

表 9. Nam, 2-Py, 4-Py の HPLC 分析条件

分析カラム	CHEMCOSORB 7-ODS-L (平均粒子直径, 7 $\mu\text{m}$ ; 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, 株式会社ケムコ, 大阪)
移動相	10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 3.0) / アセトニトリル (96 : 4, v/v)
移動相流速	1.0 ml / min
検出波長	260 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 $\mu\text{l}$

表 10. MNA の HPLC 分析条件

分析カラム	TSKgel ODS-80Ts (平均粒子直径, 5 $\mu\text{m}$ ; 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, 東ソー株式会社, 東京)
移動相	1 g/L 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムおよび 1 mM EDTA-2Na を含む 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 3.0) - アセトニトリル (78 : 22 v/v)
移動相流速	1.0 ml / min
検出波長	Ex. 382 nm, Em. 440 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 $\mu\text{l}$

表 11. 一般乳酸菌接種用培地の組成 39.6g (1 L) 分中

酵母エキス	5.5 g	硫酸マンガン	5.0 mg
酢酸ナトリウム	10.0 g	リン酸二水素カリウム	0.25 mg
ペプトン	12.5 g	硫酸第一鉄	5.0 mg
硫酸マグネシウム	0.1 g	リン酸一水素カリウム	0.25 mg
ブドウ糖	11.0 g		

表 12. パントテン酸定量用 2 倍濃度基礎培地の組成 (1L 分中)

カザミノ酸	14 g	ニコチン酸	1 mg
L-システイン	400 mg	塩酸ピリドキシン	800 µg
DL-トリプトファン	200 mg	リン酸二水素カリウム	1 g
硫酸アデニン	20 mg	リン酸水素二カリウム	1 g
塩酸グアニン	20 mg	硫酸マグネシウム	400 mg
ウラシル	10 mg	硫化第一鉄	20 mg
塩酸チアミン	200 µg	硫酸マンガン	20 mg
リボフラビン	400 µg	酢酸ナトリウム (無水)	20 g
パラアミノ安息香酸	200 µg	ブドウ糖	40 g
ビオチン	0.8 µg		Final pH7.1 ± 0.1

表 13. パントテン酸定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	終パントテン酸濃度 (nmol/tube)	1 nmol/ml パントテン酸溶液 (µl)	H <sub>2</sub> O (µl)	0.5 M リン酸カリウム緩衝液 pH7.0 (µl)	パントテン酸定量用 2 倍濃度基礎培地 (ml)	Total (ml)
0	0.000	0	800	200	1	2
1	0.025	25	775	200	1	2
2	0.050	50	750	200	1	2
3	0.075	75	725	200	1	2
4	0.100	100	700	200	1	2
5	0.125	125	675	200	1	2
6	0.150	150	650	200	1	2
7	0.200	200	600	200	1	2
試料	<i>x</i>	<i>a</i>	800- <i>a</i>	200	1	2

表 14. 葉酸定量用 2 倍濃度基礎培地の組成 94.0 g (1 L) 分中

豚消化物カゼイン	10.0 g	キサンチン	20.0 mg
デキストロース	40.0 g	塩化ナトリウム	20.0 mg
酢酸ナトリウム	40.0 g	硫化鉄	20.0 mg
リン酸水素二カリウム	1.0 g	硫化マンガン	15.0 mg
リン酸水素カリウム	1.0 g	硫化アデニン	10.0 mg
L-アスパラギン	0.6 g	グアニン塩酸塩	10.0 mg
L-システイン塩酸塩	0.5 g	ウラシル	10.0 mg
マグネシウム硫酸塩	0.2 g	グルタチオン塩酸塩	5.0 mg
DL-トリプトファン	0.2 g	ピリドキシン塩酸塩	4.0 mg
ポリソルベート 80	0.1 g	パラアミノベンゾイル酸	2.0 mg
リボフラビン	1.0 mg	パントテン酸カルシウム	800 µg
ニコチン酸	800 µg	チアミン塩酸塩	400 µg
ビオチン	20 µg		

表 15. 葉酸定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	1ng/ml プテロイル モノ グルタミン酸 (µl)	終プテロイルモノ グルタミン酸濃度 (ng/tube)	H <sub>2</sub> O (µl)	0.2 M リン酸 カリウム 緩衝液 (µl)	葉酸定量用 2 倍濃度基礎 培地 (ml)	Total (ml)
0	0	0.00	800	200	1	2
1	25	0.025	775	200	1	2
2	50	0.05	750	200	1	2
3	100	0.10	700	200	1	2
4	150	0.15	650	200	1	2
5	200	0.20	600	200	1	2
6	250	0.25	550	200	1	2
7	300	0.30	500	200	1	2
8	350	0.35	450	200	1	2
試料	a	x	800-a	200	1	2

表 16. ビオチン定量用基礎培地 組成全量 1L 分

カザミノ酸	14 g	ニコチン酸	1 mg
L-シスチン	400 mg	塩酸ピリドキシン	800 µg
DL-トリプトファン	200 mg	リン酸二水素カリウム	1 g
硫酸アデニン	20 mg	リン酸一水素カリウム	1 g
塩酸グアニン	20 mg	硫酸マグネシウム	400 mg
ウラシル	20 mg	硫酸第一鉄	20 mg
塩酸チアミン	200 µg	硫酸マンガン	20 mg
リボフラビン	400 µg	酢酸ナトリウム(無水)	20 g
パラアミノ安息香酸	200 µg	ブドウ糖	40 g
パントテン酸	400 µg		

表 17. ビオチンの定量操作方法 (全量 2ml)

試験管 No.	ビオチン量 (ng / tube)	2 倍濃度基礎培地 (ml)	1 ng/ml ビオチン標準液 またはサンプル(µl)	0.5 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 緩衝液, pH7.0 (µl)	水 (µl)
1	0	1	0	200	800
2	0.02	1	20	200	780
3	0.04	1	40	200	760
4	0.06	1	60	200	740
5	0.08	1	80	200	720
6	0.1	1	100	200	700
サンプル	x	1	50	200	750

表 18. AsA の HPLC 分析条件

分析カラム	µBondasphere C <sub>18</sub> 5µm 100 Å (3.9 mm I.D. × 150 mm、日本ウォーターズ株式会社、東京)
移動相	アセトニトリル / 0.1% トリエチルアミン溶液 (1 : 1, v/v)
移動相流速	1.0 ml / min
検出波長	505 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 µl



表 19. キノリン酸の HPLC 分析条件

分析カラム	Unisil Q C 18 (平均粒子直径, 5 $\mu\text{m}$ ; 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, ジーエルサイエンス株式会社, 東京)
移動相	1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH was adjusted to 3.8 by 0.2 M citric acid) 50 ml, 過酸化水素を 40 ml, 15% TMA 30 $\mu\text{l}$ を超純水で 1000 ml とした.
移動相流速	0.6 ml / min
検出波長	Ex. 326 nm, Em. 380 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 $\mu\text{l}$

表 20. クレアチニン定量操作のための各試薬の分注量の一覧表

No.	1 mg/L クレアチニン 標準溶液 ( $\mu\text{l}$ )	$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ )	アルカリ飽和 ピクリン酸 ( $\mu\text{l}$ )	Total (ml)
0	0	800	560	1.36
1	2	798	560	1.36
2	4	796	560	1.36
3	6	794	560	1.36
4	8	792	560	1.36
5	10	790	560	1.36
6	12	788	560	1.36
試料	<i>a</i>	800- <i>a</i>	560	1.36

表 21. 血漿中のビタミン B<sub>6</sub> HPLC システム

分析カラム	Tosoh ODS 80Ts (平均粒子直径, 5 μm ; 4.6 mm I.D. × 250 mm, 東ソー株式会社)
移動相流速	0.7 ml / min
反応液流速	0.1 ml / min
pressure	移動相 : 81 kg/cm <sup>2</sup> , 反応液 : 6 kg/cm <sup>2</sup>
検出波長	蛍光法, 励起波長 325 nm , 蛍光波長 425 nm
カラム温度	35°C
コイル温度	75°C
試料導入装置内温度	室温
試料注入量	20 μl
溶出時間	PLP : 9.7 min , PL : 8.7 min
終了時間	データプロセッサ : 15 min , オートインジェクター : 30 min
感度の設定	GAIN 1, SENS 2 (atten 6)

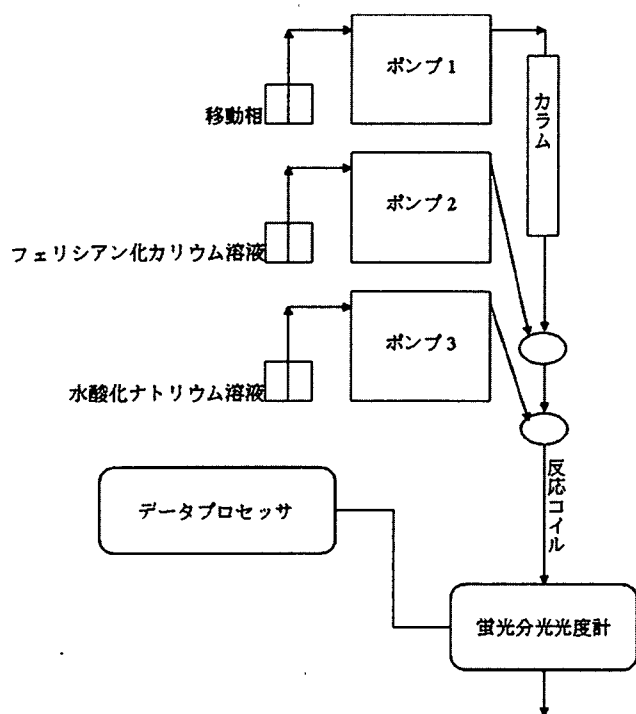


図 1. ビタミン B<sub>1</sub> 測定用 HPLC システム構成図

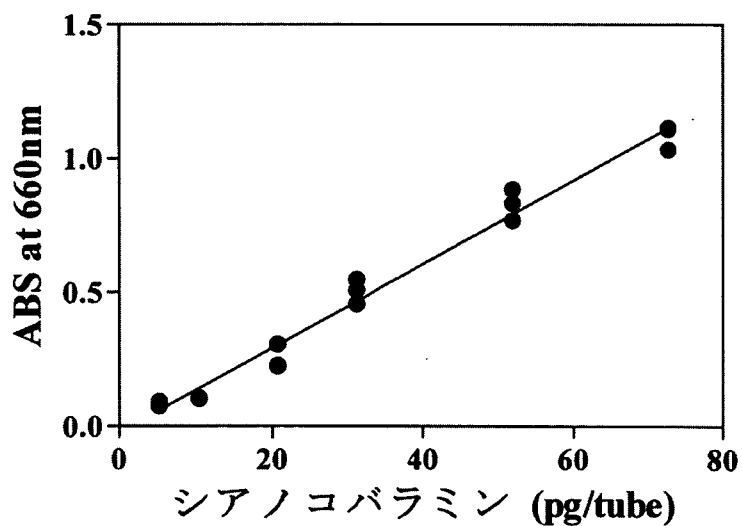


図 2. シアノコバラミン濃度に対する *Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830 のレスポンスの一例

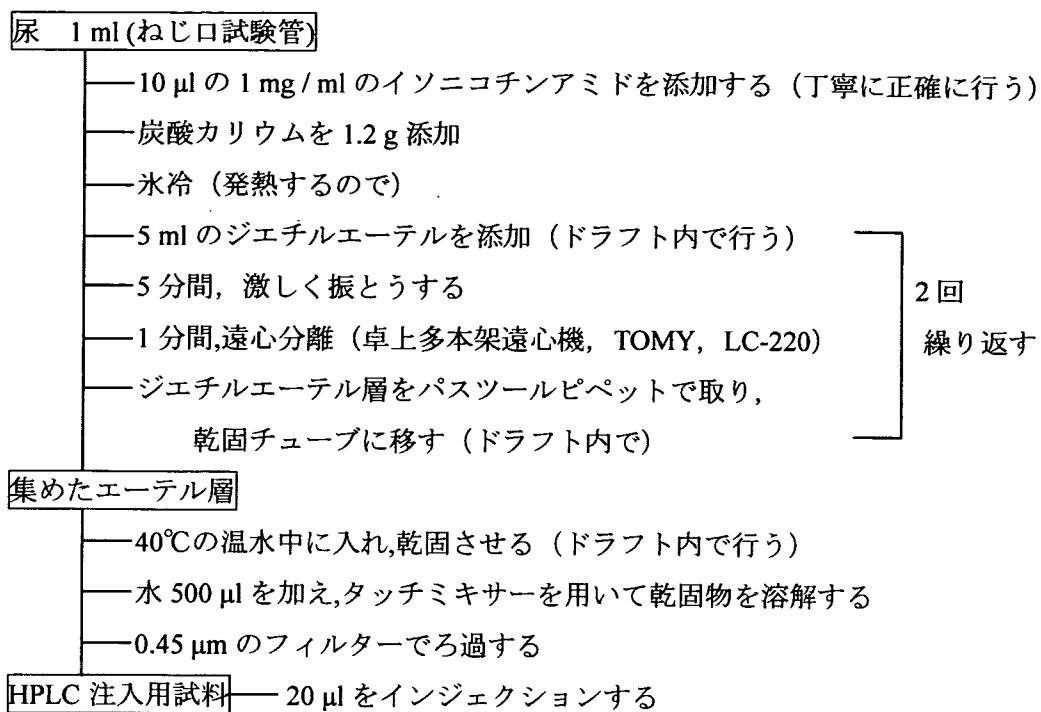


図 3. Nam, 2-Py, 4-Py 測定のために用いる尿の処理方法

- ① 20  $\mu$ l 標準 . . . . . 20  $\mu$ g/ml MNA 標準 20  $\mu$ l + 水 780 ml = 800  $\mu$ l
- ② 40  $\mu$ l 標準 . . . . . 20  $\mu$ g/ml MNA 標準 40  $\mu$ l + 水 760 ml = 800  $\mu$ l
- ③ 試料 . . . . . 尿 100  $\mu$ l + 水 700  $\mu$ l = 800  $\mu$ l

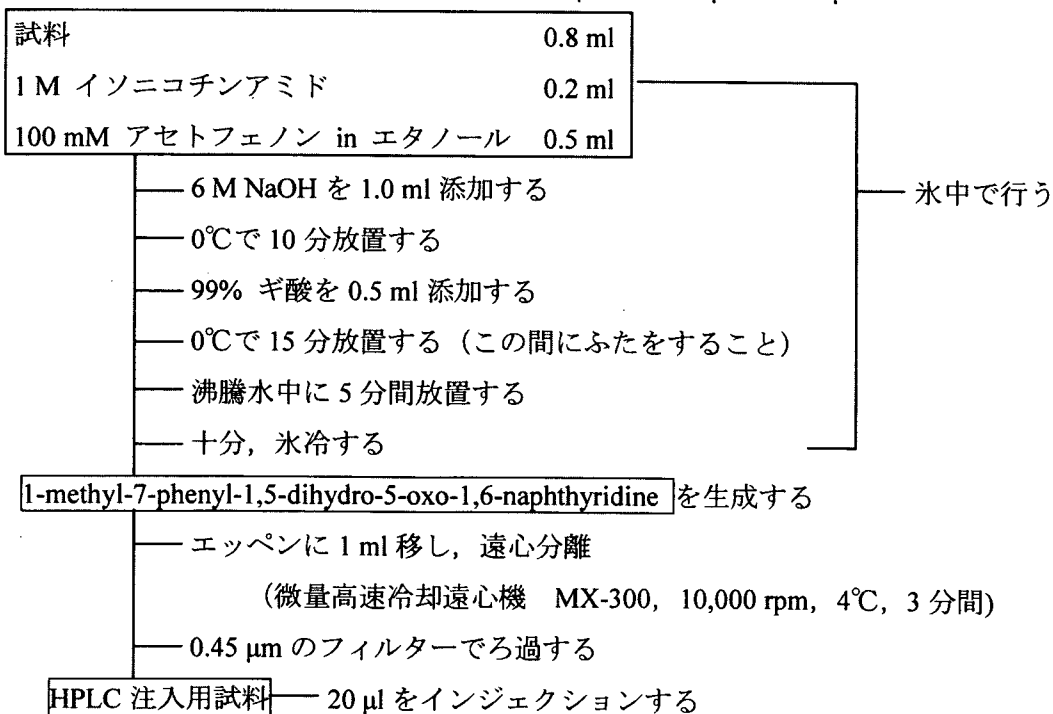


図 4. MNA 測定のために用いる尿の処理方法

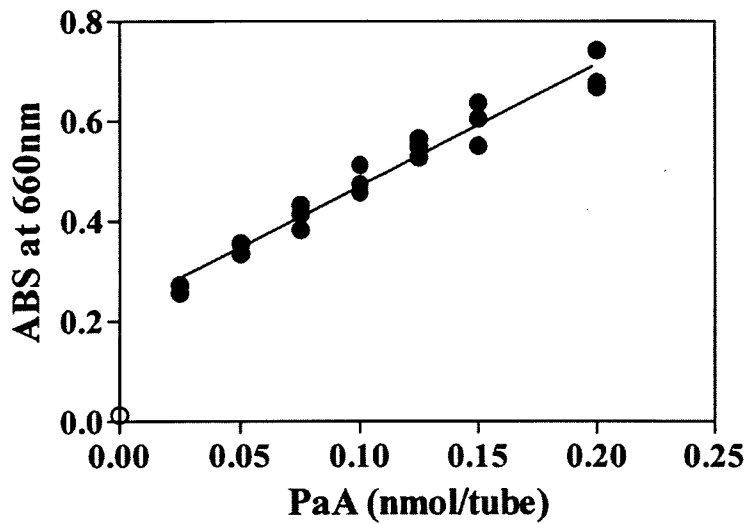


図 5. パントテン酸濃度に対する *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) のレスポンスの一例

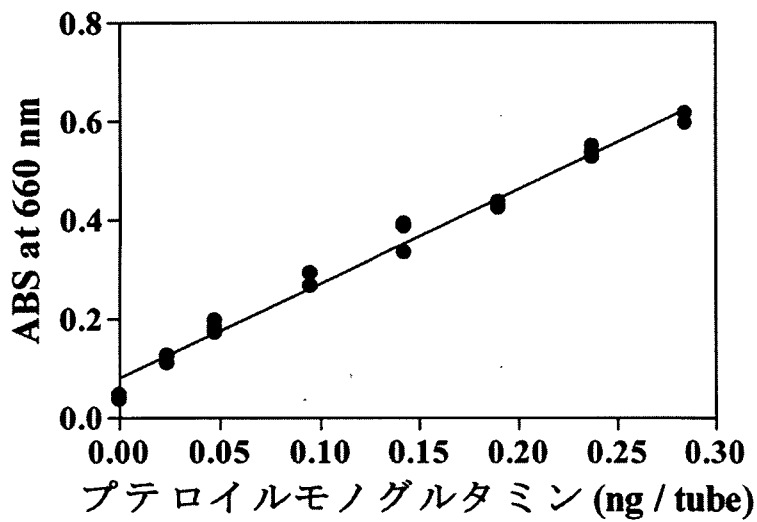


図 6. プテロイルモノグルタミン酸濃度に対する *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 のレスポンスの一例

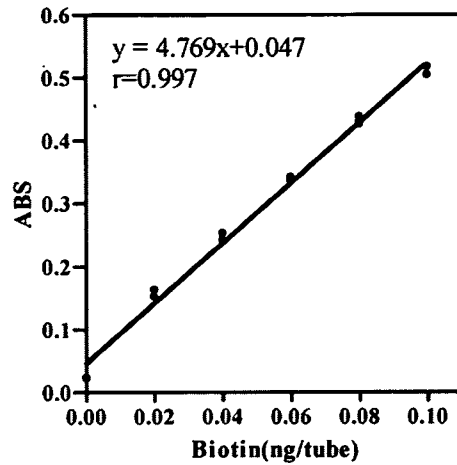


図 7. ビオチン標準に対する *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 のレスポンスの一例

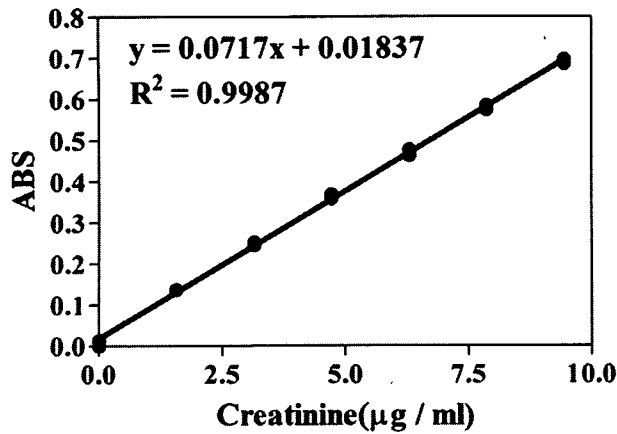


図 8. クレアチニンの検量線の一例

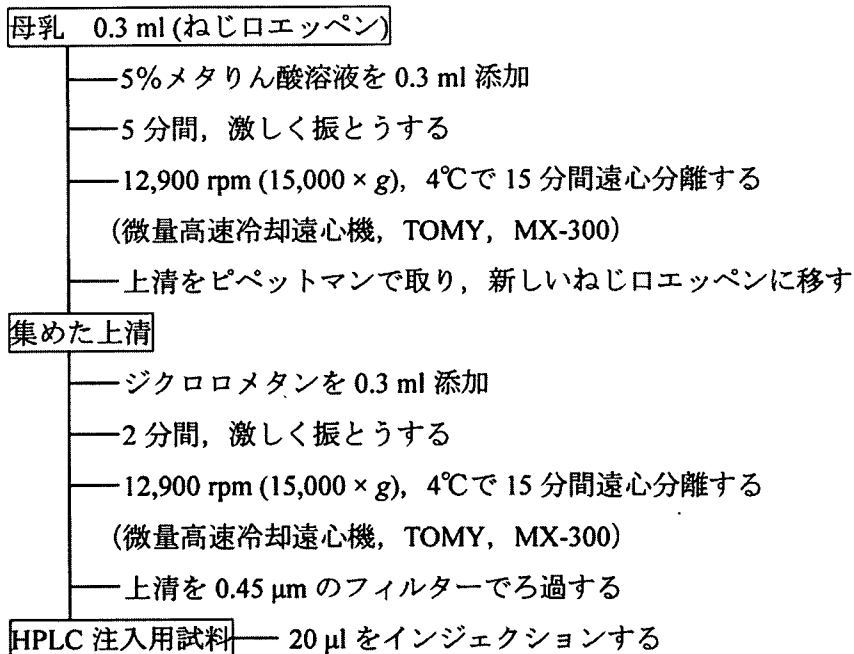


図 9. 血漿中のビタミン B<sub>6</sub> の HPLC 測定用試料溶液の作成操作

## Ⅲ. 分担研究者の報告書

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

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

#### 1. 健康な日本人幼児の水溶性ビタミンの尿中排泄量

分担研究者	佐々木 敏	東京大学大学院	教授
主任研究者	柴田 克己	滋賀県立大学	教授
研究協力者	福渡 努	滋賀県立大学	助教
研究協力者	芳賀めぐみ	尚絅学院大学	講師
研究協力者	坂田 隆	石巻専修大学大学院	教授

#### 研究要旨

我々は、水溶性ビタミンの栄養状態の指標として、水溶性ビタミンの1日尿中排出量を使用することを提案している。我々は、はじめて、2～5歳の幼児の1日尿を正確に集めることに成功したので（n=91）、水溶性ビタミンのすべてを測定した。男女間でビタミンの排泄量には違いが認められなかったため、性別を区別せずに、値は処理した。ビタミンB<sub>1</sub>（チアミン）、ビタミンB<sub>2</sub>（リボフラビン）、ニコチンアミド（N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド、N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミドや、N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミドなどのニコチンアミドの異化代謝物の合計量）、ビタミンB<sub>6</sub>（4-ピリドキシニン酸、ビタミンB<sub>6</sub>の異化代謝産物）、ビタミンB<sub>12</sub>（シアノコバラミン）、パントテン酸、葉酸、ビオチン、およびビタミンC（還元型と酸化型アスコルビン酸と2,3-ジケトグルコン酸の合計量）は、各々428±277 nmol/日、494±389 nmol/日、48±27 μmol/日、2.8 ±1.3 μmol/日、37±19 pmol/日、9.8 ± 3.3 日 μmol/日、14.5±8.9 nmol/日、28.7±14.2 pmol/日、および267±313 μmol/日であった。



## A. 目的

個々人の有する代謝能力を最大限に発揮するには栄養素の適切な摂取が必要であると考え。従来の栄養指導の根本は、摂取した栄養素の量を「食品成分表」から計算し、その計算値と「食事摂取基準」とを比較し、それらの数値の比較により評価し、指導するというものであった。すなわち、食品側の指標と基準値によって栄養評価がなされていた。食事記録には様々な方法が考案されているが、いずれの方法においても、食事側の情報だけで、食べた後の情報、代謝を考慮した栄養評価はなされてこなかった。我々は、ここではこのことを生体側の情報と呼ぶ。

20世紀初頭に、はじめて、壊血病、くる病、とり目、ペラグラや脚気といった病気が、病原菌によるものではなく、ヒトが必要とする食品成分の欠如によって起こることが解明された。これらの病気は、今では、ビタミンと呼ばれている微量栄養素の欠乏によって起こることが解明され、必要量（欠乏を予防するに足る最小摂取量）も提言されている。

ヒトに同じ量の栄養素を摂取させても、個々人によって応答は異なる。例えば、血液中の栄養素の値、尿中の値などである。遺伝的素因がほぼ同じで、管理も厳密に行える動物実験においても個体差が認められる。この原因については、未だに誰も明確な回答を導き出すことはできない。しかしながら、科学的な考え方ではないかもしれないが、代謝が神経的なあるいは精神的といってもよいかもしれないが、我々が未だ知らない未知の要因によって影響を受けることを意味していると考えられる。

ヒトを被験者とする場合、通常得られる生体成分は尿と血液である。栄養学領域では、

基本的に健康なヒトを扱う。健康なヒトが寿命の限界まで健康にすごしたいという欲望を手助けするための学問領域である。多量栄養素である脂質、タンパク質、糖質が体内に貯蔵されていることは良く知られている。一方、微量栄養素であるミネラルとビタミンも体内に貯蔵されている。まだ、十分に証明されていないが、我々は体内の貯蔵量にも適正量があると考えている。科学的な表現ではないが、少なすぎても多すぎてもいけないと考えている。この下と上の量を知り、常に適正量の備蓄をしていれば、少々の代謝変動が起きても（例えば、急にエネルギー消費量が高まった時、脳は休めとっているのに、体を休めることが出来ないときなど）、有事の臨戦態勢を乗り切ることができると考えている。

この目的のためには、血液よりも尿が適していることがわかっている。今までの動物実験の研究成果によれば、体内のビタミン貯蔵量は、肝臓中のプールが飽和されると血清中のプールに流れる。そして、血清中のプールが飽和されると、はじめて尿中に排泄が認められる。ヒトにおいても、この考え方が適用できるものと考えている。

そこで、我々は、寿命の限界まで健康に過ごせるための適正ビタミン摂取量の評価の指標として、尿中のビタミン排泄量を利用するために、各年齢層の適正尿中排泄量を調べている。

この報告では、2～5歳の健康な幼児の尿中のビタミン排泄量を調べ、これらの値を基にして、この年齢層の適正尿中排泄量を提言する。

## B. 実験方法

## 1. 被験者

健康な2~5歳の男女幼児である<sup>1)</sup>。被験者の体格を表1に示した。なお、本研究は、独立行政法人国立健康・栄養研究所倫理審査委員会において承認を受け、ヘルシンキ宣言の精神に則って行われたものである。

## 2. 畜尿方法と採取した尿の処理方法

蓄尿中の尿は氷中に保存し、24時間尿を採取後、直ちに容量を測定した。水溶性ビタミンは化学構造上の違いから、安定化条件が異なる。ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>、ビタミンB<sub>6</sub>の異化代謝産物である4-ピリドキシン酸、ナイアシンとその異化代謝産物であるN<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド(MNA)、N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)、N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)の測定のためには、尿9mlに1mol/L HClを添加した後、-20°Cで保存した。ビタミンCは、尿5mlに10%メタリン酸5mlを加え、-20°Cで保存した。葉酸は、1mol/LのL-アスコルビン酸溶液0.9mLの入った試験管に尿を8.1mL添加した後、-20°Cで保存した。パントテン酸とビオチンは、尿をそのまま-20°Cで保存した。

## 3. 尿中のビタミンの測定方法

### ビタミンB<sub>1</sub>

定量の標準品として使用したチアミン塩酸塩は和光純薬工業株式会社(大阪)から購入した。尿中のビタミンB<sub>1</sub>の定量方法は文献8に示したHPLC法で行った。値はチアミンとして示した。

### ビタミンB<sub>2</sub>

定量の標準品として使用したリボフラビンは和光純薬工業株式会社(大阪)から購入した。尿中のビタミンB<sub>2</sub>の定量方法は、文献9に記載されたHPLC法に従って測定した。

### ビタミンB<sub>6</sub>の異化代謝産物4-ピリドキシン酸

定量の標準品として使用した4-ピリドキシン酸はSigma Chemical Company(米国)から購入した。尿中の4-ピリドキシン酸の定量方法は文献10に記載されたHPLC法を用いて測定した。

### ナイアシンの異化代謝産物MNA, 2-Py, 4-Py

MNA 定量の標準品として使用したMNA塩酸塩は東京化成工業株式会社(東京)から購入した。尿中のMNAの定量は、MNAを強アルカリ性下でアセトフェノンと縮合させることにより蛍光物質に変換した後測定するHPLC法を用いた<sup>11)</sup>。

2-Py 定量の標準品として使用した2-PyはPullmanとColowick<sup>12)</sup>の方法にしたがって合成した。4-Py 定量の標準品として使用した4-PyはShibataら<sup>13)</sup>の方法にしたがって合成した。尿中の2-Pyおよび4-Pyは弱アルカリ性下で、ジエチルエーテルで抽出後、HPLCで同時定量する方法を用いた<sup>13)</sup>。

### パントテン酸

定量の標準品として使用したパントテン酸カルシウムは和光純薬工業株式会社(大阪)から購入した。尿中のパントテン酸定量は、尿を直接試料検体として、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014を用いる微生物学的定量方法で行った<sup>14)</sup>。

### 葉酸

定量の標準品として使用したプテロイルモノグルタミン酸は和光純薬工業株式会社(大阪)から購入した。尿中の葉酸定量は、尿を直接試料検体として、*Lactobacillus casei* ATCC 2773を用いる微生物学的定量方法で行った<sup>15)</sup>。

### ビオチン

定量の標準品として使用した D(+)-ビオチンは和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。尿中のビオチン酸定量は、尿を直接試料検体として、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いる微生物学的定量方法で行った<sup>16)</sup>。

## ビタミン C

定量の標準品として使用した L-アスコルビン酸は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。尿中のビタミン C 定量は、Kishida ら<sup>17)</sup>の方法にしたがって、行った。

## C. 結果と考察

### 1. 男女差の有無

被験者となった幼児の年齢、身長、体重および BMI を男と女で比較したが、有意な差異は認められなかった 3 倍、(表 1)。

また、測定した各種ビタミンの尿中排泄量においても、男と女の間では差異は認められなかった（データは省略）。

### 2. 幼児の尿中へのビタミン排泄量

#### 2-1. 1 日尿当たりの排泄量

幼児の 1 日尿中に排泄されるビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、ナイアシンおよびその異化代謝産物の合計排泄量、4-ピリドキシン酸（ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物）、ビタミン B<sub>12</sub>、パントテン酸、葉酸、ビオチン、ビタミン C の各排泄量を表 2 に示した。また、各ビタミンの 1 日尿中排泄量のヒストグラムを図 1 に示した、これらの値をみると、すべてのビタミンにおいて、個人差が高いことが特徴であった。

最低値と最高値の比率を計算すると、ビタミン B<sub>1</sub> では 53 倍 (1641/31)、ビタミン B<sub>2</sub> では 62 倍 (2160/35)、ナイアシンでは 9 倍 (177/19)、ビタミン B<sub>6</sub> では 16 倍 (11.0/0.7)、

ビタミン B<sub>12</sub> では 18 倍 (92/5)、パントテン酸では 4.5 倍 (18.5/4.1)、葉酸では 23 倍 (86.8/3.7)、ビオチンでは 33 倍 (80.4/2.4)、ビタミン C では 222 倍 (1778/8) であった。

5%タイル値と 95%タイル値を比較すると、ビタミン B<sub>1</sub> では 8.3 倍 (976/117)、ビタミン B<sub>2</sub> では 12.9 倍 (1112/86)、ナイアシンでは 5.0 (107/21)、ビタミン B<sub>6</sub> では 3.3 倍 (4.5/1.3)、ビタミン B<sub>12</sub> では 15 倍 (75/5)、パントテン酸では 3.2 倍 (17/5)、葉酸では 3.3 倍 (24/7)、ビオチンでは 5.9 倍 (59/10)、ビタミン C では 36.8 倍 (921/25) であった。当然のことではあるが、いずれのビタミンにおいても比率は著しく小さい値となった。

表 2 に成人から体表面積比を用いて外挿した尿中適正排泄量を示した。これらの値を用いて、各ビタミンにおいて低値を示したパーセンテージを求めると、表 2 に示したように、ビオチンが 27%、ビタミン C が 19%と、高い数値を示し、基準値以下の幼児が多く認められた。逆に、基準値以上のパーセンテージを求めると、ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、ビタミン B<sub>6</sub>、パントテン酸、葉酸、ビタミン C とほとんどの水溶性ビタミンにおいて高い頻度が認められた。したがって、成人の介入試験から求めた基準値を体表面積を用いて外挿した値をそのまま幼児の基準値として使用するには、さらなる検討が必要であることを意味していると思われるが、暫定的には、表 2 に記載した基準値を幼児用として提案する。

#### 2-2. クレアチニン当たりの排泄量

表 3 は幼児の 1 日尿中のクレアニン排泄量を示した。また、クレアチン当たりの排泄量を図 2 に示した。最低値と最高値の比率を計算すると、3.9 倍 (531/137) のひらきが認め

られた。5%タイル値と95%タイル値を比較すると、2.4倍(426/180)のひらきとなった。

表4は尿中へのビタミン排泄量をクレアチニン当たりで計算した値である。表2において、1日尿中に排泄されるビタミンの基準値を暫定的ではあるが提言した。

一方において、幼児の場合は、1日尿を採ることは、非常に困難を伴う。そこで、実用的なことを考えると、精度は1日尿当たりと比較すると落ちるが、幼児において、随時尿に排泄されたビタミン量から、ビタミンの栄養状態を評価する方法も考えおく必要がある。表2に記載した1日尿中の基準値の算定方法とは矛盾するが、クレアチン当たりの基準値の算定では、今回得られた値を「是」として、基準値の算定を試みた。その結果は同じく表4に示した。この値を利用して、1日尿を集めにくい幼児のビタミンの栄養評価を行い、栄養指導を行いたい。

### 3. 尿量とビタミンB<sub>12</sub>排泄量との関係

ビタミンB<sub>12</sub>の尿中排泄量が尿量にしていることを成人ですでに報告しているが、幼児においても、**図3**に示したように、認められた。つまり、尿中のビタミンB<sub>12</sub>濃度は一定であることを意味している。

## D. 健康危険情報

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)

む)

### 1. 特許予定

なし

### 2. 実用案登録

なし

### 3. その他

## G. 引用文献

1. Melnick D, Hochberg M, Oser BL. 1945. Physiological availability of the vitamins. *J Nutr* **30**: 67-79
2. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H and Hashizume N. 2005. 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 Intakes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 51:319-328
3. Haga M, Sakata T. 2007. Estimation of overnight urine volume and 24-hour urine volume in 237 healthy Japanese infants. *J Jpn Soc Nutr Food Sci*, 60, inpress
4. Pullman ME, Colowick SP. 1954. Preparation of 2- and 6-pyridones of N<sup>1</sup>-methylnicotinamide *J Biol Chem* **206**:121-127
5. Shibata K, Kawada T, Iwai K. 1988. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major