

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻	頁	出版年
Fukuwatari T, Wada H, Shibata K	Age-related alterations of B-group vitamin contents in urine, blood and liver from rats.	<i>J Nutr Sci Vitaminol</i>	54	347-352	2008
福渡努, 柴田克己	水溶性ビタミン混合剤投与中止1週間後の尿中水溶性ビタミン排泄量	ビタミン	82	601-606	2008
福渡努, 柴田克己	パンを主食とした食事に含まれる水溶性ビタミンの遊離型ビタミンに対する相対利用率	日本家政学会誌	60	57-63	2009
Takahashi K, Okuno A, Fukuwatari T, Shibata K	Comparison of the nicotinamide catabolism among rat strains.	<i>Biosci Biotechnol Biochem</i>	73	274-279	2009
Fukuwatari T, Fujita M, Shibata K.	Effects of UVA irradiation on the concentration of folate in human blood.	<i>Biosci Biotechnol Biochem</i>	73	322-327	2009
塩川真人, 水谷泰輔, 吉田宗弘	誘導体化とガスクロマトグラフィ—質量分析によるセレン強化食品中の含セレンアミノ酸の同定—	<i>Trace Nutrients Research</i>	25	144-151	2008
Yoshida M, Sano K, Ishiyuki E, Nishiyama T, Fukunaga K.	Assessment of nutritional availability of selenium in selenium-enriched pumpkin.	<i>Biomed Res Trace Elements</i>	18	391-394	2007
Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Ozaki R, Tanaka K, Okano T.	Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women.	<i>J Bone Miner Metab</i>	26	79-85	2008

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻	頁	出版年
Nakamura K, Tsugawa N, Saito T, Ishikawa M, Tsuchiya Y, Hyodo K, Maruyama K, Oshiki R, Kobayashi R, Nashimoto M, Yoshihara A, Ozaki R, Okano T, Yamamoto M.	Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study.	<i>Bone</i>	42	271-277	2008
Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H, Tsuji H, Shide K, Kamao M, Chiba T, Inagaki N, Okano T, Kido S.	High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease.	<i>Osteoporos Int</i>		DOI10.1007/s00198-008-0764-2	2008

## VII. 研究成果の刊行物・別刷

## ノート

葉酸の大量摂取が幼若ラットの成長と  
水溶性ビタミン排泄におよぼす影響

(平成 19 年 8 月 2 日受理)

福渡 努\* 柴田克己

Effects of Excess Folic Acid on Growth and Metabolism of  
Water-soluble Vitamins in Weaning Rats

Tsutomu FUKUWATARI\* and Katsumi SHIBATA

Laboratories of Food Science and Nutrition, Department of Life Style Studies,  
School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture:  
2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan;

\* Corresponding author

In order to determine the tolerable upper intake level of folic acid in humans, we investigated the effects of excessive folic acid administration on the body weight gain, food intake, tissue weight, and metabolism of B-group vitamins in weaning rats. The rats were freely fed ordinary diet containing 0.0002% folic acid (control diet) or the same diet with 0.01%, 0.1%, or 1.0% folic acid for 29 days. The body weight gains and food intakes did not differ among the four groups. Diarrhea was not seen even in the 1.0% group. Excess folic acid did not affect the tissue weights of the brain, heart, liver, kidney, spleen, lung, or testis, or urinary excretion of other B-group vitamins. These results clearly showed that feeding a diet containing up to 1.0% folic acid did not affect the food intake, body weight gain, tissue weight, or urinary excretion of B-group vitamins in weaning rats.

(Received August 2, 2007)

**Key words:** 葉酸 folic acid; 過剰 excess; 上限量 tolerable upper intake level; ビタミン vitamin; ラット rat; 尿 urine

## 緒 言

葉酸はB群ビタミンの1つである。近年、妊娠初期の葉酸の十分な摂取は、胎児神経管閉鎖障害の予防に効果があるとされている<sup>1)</sup>。現在、妊婦への400 $\mu$ g/日の葉酸摂取が厚生労働省から通知されている<sup>2)</sup>。通常の食品のみからの摂取は200 $\mu$ g/日程度であるため、400 $\mu$ g/日の葉酸を摂取するには、諸外国のようにサプリメントによる補足が必要となる。しかし、その簡便性や知識不足などによって過剰摂取する危険性があり、健康障害の発現が懸念される。また、葉酸の大量摂取により、ビタミンB<sub>12</sub>不足によって起こる巨赤芽球性貧血を隠してしまう<sup>3)</sup>危険性も指摘されている。

葉酸の過剰摂取による健康障害の発現を予防するには、上限量、すなわち「健康障害をもたらす危険がないと見なされる習慣的な摂取量の上限を与える量」を設定する必要

がある。日本人の食事摂取基準(2005年版)<sup>4)</sup>において、悪性貧血患者に対する治療のための投与量、あるいは受胎前後の3か月以上の間の葉酸投与結果<sup>5)</sup>に基づき、18歳以上の男女の葉酸の上限量は1,000 $\mu$ g/日と策定された。策定根拠に用いられた報告は葉酸の上限量を求めるために実施されたものではないが、健康障害を発現する危険性のある実験をヒトを対象として実施するのは倫理上極めて困難である。

本研究では、葉酸の過剰摂取に関する基礎データを得ることを目的として、大量の葉酸を含む食餌を与えて幼若ラットを飼育し、体重増加量、飼料摂取量および臓器重量におよぼす影響を調べた。また、尿、血液、肝臓中の葉酸量を測定することにより葉酸の体内動態について、尿中の水溶性ビタミン排泄量を測定することにより水溶性ビタミン代謝におよぼす影響についても検討した。

## 実験方法

## 1. 動物飼育

3週齢のWistar系雄ラット20匹を日本クレア株式会

\* 連絡先

滋賀県立大学人間文化学部生活文化科学食生活専攻: 〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町2500

社より購入し、5匹ずつ4群に分けた。20% カゼイン食投与群を対照群とし、大量投与群は20% カゼイン食に葉酸を0.01%、0.10%、あるいは1.0% 添加した飼料を与え、ラット用代謝ケージにて飼育した。食餌にはビタミンとしてAIN-93VX<sup>®</sup>を1.0% となるように加えた。実験開始日をDay 0として、Day 28の24時間尿を1日尿として集めた。尿は塩酸性下で集め、採尿後、分析に供するまで-20℃で保存した。採尿終了後、ラットを断頭屠殺し、採血および肝臓、腎臓、肺、脾臓、心臓、精巣、脳を摘出し、各臓器重量を測定した。飼育室の温度は22℃前後、湿度は50%前後に維持し、午前6時～午後6時を明、午後6時～午前6時を暗とした。本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。

## 2. 分析

尿中のチアミン<sup>7)</sup>、リボフラビン<sup>8)</sup>、ビタミンB<sub>6</sub>代謝産物4-ピリドキシン酸(4-PIC)<sup>9)</sup>、アスコルビン酸<sup>10)</sup>はHPLC法により測定した。ニコチンアミド(Nam)<sup>11)</sup>、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド(MNA)<sup>12)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)<sup>13)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)<sup>14)</sup>はHPLC法により測定し、これらの合計を総ニコチンアミド代謝産物とした。ビタミンB<sub>12</sub><sup>15)</sup>、パントテン酸<sup>16)</sup>、葉酸<sup>15)</sup>、ピオチン<sup>16)</sup>は微生物学的定量法により測定した。

## 3. 有意差検定

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、まず一元配置の分散分析を行い、有意差が認められたときにはTukey-Kramerの多重比較テストを行った。有意差は $p < 0.05$ で判定した。検定には統計ソフトInstat (version 2.0; GraphPad社より購入。San Diego, CA, USA)を使用した。

## 結果および考察

### 1. 葉酸の大量投与が幼若ラットの体重増加量と飼料摂取量におよぼす影響

Control食群と葉酸を添加した3群との間には、体重増加量と飼料摂取量に有意な差異は認められなかった(表1)。飼育中、下痢をしているラットはいなかった。また肉眼的所見において、毛並み、臓器に影響は認められず、行動異常も認められなかった。

### 2. 葉酸の大量投与が臓器重量におよぼす影響の比較

Control食群と葉酸を添加した3群との間には、脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、肺、精巣の各重量には差異は認められなかった(表2)。

ラットに葉酸(300 mg/kg体重)を週1回の頻度で5週間連続皮下注射すると、腎機能障害をとまなう間質性腎炎を起こすことが報告されている<sup>17)</sup>。今回の実験では、腎機能に関する検査を行っていないために詳細は不明であるが、肉眼的な観察においては腎臓に異常は認められなかった。なお、本実験における1.0%葉酸添加食群の飼料摂取量はDay 20以降はほぼ一定であり、Day 29の飼料摂取量の平均は15.8 g/日であったことから、実験最終日におけるラット1匹あたりの葉酸摂取量は158 mg/日であった。体重1 kgあたりに換算すると、実験最終日のラットの体重が190 gであるので、832 mg/kg体重となる。同様の計算を行うと、Day 1における葉酸摂取量は1,033 mg/kg体重、Day 15では1,180 mg/kg体重となる。

このように、混餌投与の場合は、1日あたりの摂取量は皮下注射投与により腎障害を引き起こした量よりも多い。皮下注射では投与したすべての葉酸が短時間で体内に入るのに対し、食餌から大量の葉酸を摂取する場合はすべての葉酸が吸収されるとは限らず、摂取に費やす時間も長くなるために、このような違いが生じたと考えられる。したがって、上限量とは習慣的な経口摂取に対して設定される

Table 1. Effects of folic acid intake on the body weight gain and food intake

	Control	+0.01%	+0.10%	+1.0%
Initial body weight (g)	36.8±0.5	36.9±0.4	37.1±0.5	37.0±0.4
Final body weight (g)	196.1±3.9	191.5±4.7	196.9±1.1	190.4±2.9
Body weight gain (g/28d)	159.3±4.1	154.6±4.4	159.8±1.1	159.8±2.8
Food intake (g/28d)	364.6±6.2	353.2±7.7	369.8±3.6	357.6±4.3

Each value is expressed as g and is the mean±SEM (n=5).

Table 2. Effects of excessive folic acid administration on the tissue weights of rats

	Control	+0.01%	+0.10%	+1.0%
Brain	1.11 ±0.08	1.11 ±0.04	1.02 ±0.03	1.18 ±0.01
Heart	0.682±0.018	0.688±0.019	0.700±0.022	0.690±0.027
Liver	8.84 ±0.25	8.63 ±0.50	8.79 ±0.28	8.54 ±0.42
Kidney	1.59 ±0.01	1.61 ±0.03	1.68 ±0.03	1.62 ±0.02
Spleen	0.685±0.029	0.703±0.010	0.673±0.013	0.661±0.035
Lung	1.16 ±0.03	1.14 ±0.05	1.21 ±0.04	1.13 ±0.04
Testis	1.99 ±0.09	2.01 ±0.09	1.96 ±0.05	1.99 ±0.05

Each values is expressed as g and is the mean±SEM (n=5).

基準であることと合わせると、上限量の策定に必要なデータは混餌実験で得られたものである必要がある。

### 3. 葉酸の大量投与が肝臓、血液、尿中の葉酸量におよぼす影響

葉酸を大量に摂取させると、上昇する傾向にはあるものの、肝臓中の葉酸含量に有意な上昇は認められなかった(図1-A)。したがって、葉酸含有量が0.0002%であるControl食群において、肝臓中の葉酸は既に飽和状態であったと考えられる。一方、1.0%葉酸添加食群ではControl食群に比べ、血中葉酸含量は有意に高くなった(図1-B)。その値は0.01%添加食群の値とほとんど変わらなかったことから、血液中の葉酸は0.01%の葉酸添加によって飽和状態になったと考えられた。

尿中への葉酸排泄量は飼料中の葉酸含量に応じて増大した(図1-C)。葉酸排泄率(尿中の葉酸量/摂取葉酸量)は、0.01%添加食群ではControl食群と変わらなかったものの、0.10%添加食群ではControl食群の17%に、1.0%添加食群では3%にまで減少した(図1-D)。したがって、0.01%葉酸添加食群ではControl食群と同じ割合で葉酸を吸収することができたが、0.10%添加食群では吸収機構が飽和状態に達していたと考えられる。

### 4. 葉酸の大量投与がB群ビタミンの尿中排泄量におよぼす影響

葉酸を含めて、B群ビタミンは補酵素として糖質、脂質、アミノ酸代謝において共同作業を行っていることから、葉酸の大量摂取により他のB群ビタミン代謝に影響

をおよぼす可能性が考えられる。葉酸のみに着目して影響が見られなかったとしても、他のB群ビタミンに影響があれば、それは葉酸過剰摂取によるものと考えられる。しかし、チアミン、リボフラビン、ビタミンB<sub>6</sub>異化代謝産物4-PIC、ビタミンB<sub>12</sub>、ニコチンアミド総代謝産物、パントテン酸、ピオチンのいずれについても、尿中排泄量は葉酸の大量摂取による影響を受けなかった(図2)。

以上の結果から、少なくとも葉酸1.0%添加食をラットに与えても、体重増加量、臓器重量、B群ビタミン排泄量には何ら影響をおよぼさないことが明らかとなった。先に記述したように、1.0%添加食群のラットの葉酸摂取量は約1,000 mg/kg体重・日であった。この値は健康障害非発現量(no observed adverse effect level: NOAEL)に相当するが、この値はさらに高くなる可能性がある。

実験動物とヒトとの体格差の補正は、体重、エネルギー要求量および体表面積に基づいて実施することができるといわれている。この中で、最も簡単なアプローチは体重に基づく倍率調整である。仮にこの調整法を利用してヒトに対する値を算出してみると、ラットとヒトという種差の安全係数を10<sup>10</sup>、個体差の安全係数を10<sup>10</sup>、短期毒性試験であることと健康障害最低発現量(lowest observed adverse effect level: LOAEL)のデータがないことから、これらの安全係数を10と判断して、1,000で除した1 mg/kg体重/日という値が計算できる。60 kgのヒトならば、60 mg/日程度となる。現在の上限量である1 mg/日/人と比較すると極めて高い数値であるが、今後、ヒトの上限

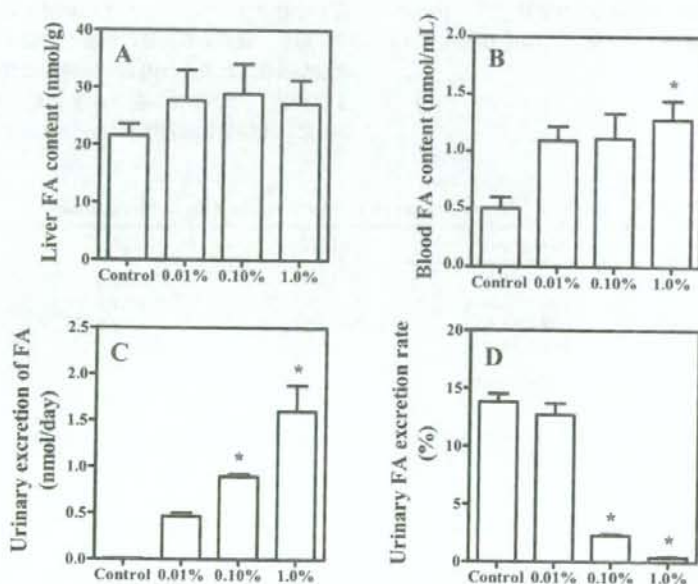


Fig. 1. Effects of excess folic acid on the contents of folic acid in liver (A), blood (B) and urine (C), and the urinary folic acid excretion rate (D)

Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). \* $p < 0.05$  versus control determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test.

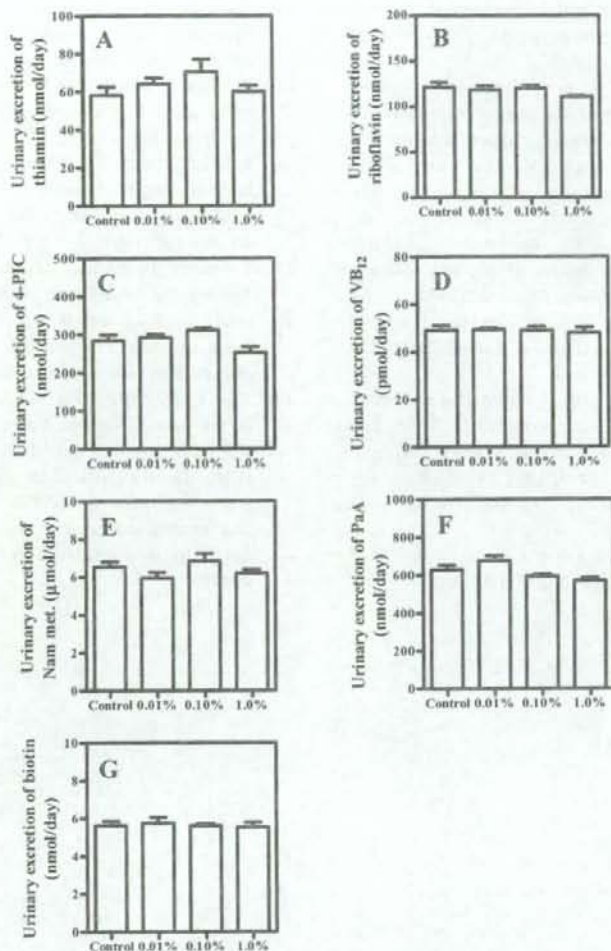


Fig. 2. Effects of excess folic acid administration on the urinary excretions of thiamin (A), riboflavin (B), 4-PIC (C), cyanocobalamin (D), nicotinamide metabolites (E), pantothenic acid (F), and biotin (G). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM (n=5).

量を策定する際の参考データの1つになるものと考えらる。

#### 謝 辞

本研究は、平成16年度～18年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究」（主任研究者、柴田克己）の成果の一部である。関係各位に謝意を表す。

#### 文 献

- Emery, A. E. F. Folate and fetal central-nervous-system malformations. *Lancet*, 309, 703 (1977).
- 「神経管閉鎖障害の発症リスク低減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, 健医地生発第78号, 平成12年12月28日, 厚生省児童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.
- Sinow, R. M., Johnson, C. S., Karnaze, D. S., Siegel, M. E., Carmel, R. Unsuspected pernicious anemia in a patient with sickle cell disease receiving routine folate supplementation. *Arch. Intern. Med.*, 147, 1828-1829 (1987).
- 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—策定委員会報告書, 2004年10月.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. The B vitamins and choline: overview and methods. In: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: For thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B<sub>6</sub>, folate, vitamin B<sub>12</sub>, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, D. C., National Academy Press (1998), p. 196-305.
- Reeves, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.*, 127, 838S-841S (1997).

- 7) Pullman, M. E., Colowick, S. P. Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*<sup>1</sup>-methylnicotinamide. *J. Biol. Chem.*, **206**, 121-127 (1954).
- 8) Shibata, K., Kawada, T., Iwai, K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*<sup>1</sup>-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28 (1988).
- 9) Kimura, M., Fujita, T., Itokawa, Y. Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. *Clin. Chem.*, **28**, 29-31 (1982).
- 10) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628 (1983).
- 11) Gregory, J. F. 3rd, Kirk, J. R. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883 (1979).
- 12) 虎谷哲夫. ビタミンB<sub>12</sub>および関連化合物の定量法. ビタミン学実験法 [II] (日本ビタミン学会編集), 東京化学同人 (1985), p. 231-242.
- 13) 柴田克己. 高速液体クロマトグラフィーによる尿中 *N*<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドの超微量定量方法. ビタミン, **61**, 599-604 (1987).
- 14) Skeggs, H. R., Wright, L. D. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26 (1944).
- 15) Tamura, T., Methods of Nutritional Biochemistry. Determination of food folate. *Nutritional Biochemistry*, **9**, 285-293 (1998).
- 16) Fukui, T., Iinuma, K., Oizumi, J., Izumi, Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 491-498 (1994).
- 17) Tsutsumi, T., Ichihara, T., Kawabe, M., Yoshino, H., Asamoto, M., Suzuki, S., Shirai, T. Renal toxicity induced by folic acid is associated with the enhancement of male reproductive toxicity of di(*n*-butyl)-phthalate in rats. *Reprod. Toxicol.*, **18**, 35-42 (2004).
- 18) Joint FAO/WHO (Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy/World Health Organization of the United Nations, Geneva, Switzerland). Development of a scientific collaboration to create a framework for risk assessment of nutrients and related substances. Background paper and request for comment/call for information, October 2004.





## 遊離型ビタミンに対する食事中のB群ビタミンの 相対利用率

福 渡 努, 柴 田 克 己

(滋賀県立大学人間文化学部)

原稿受付平成19年10月19日; 原稿受理平成20年2月2日

### Relative Availability of B-group Vitamins in a Test Diet to Free Vitamins

Tsutomu FUKUWATARI and Katsumi SHIBATA

*School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522-8533*

The relative availability of B-group vitamins to free vitamins in a test diet consumed by Japanese college women students was determined. The subjects, 6 female Japanese college students, consumed the test diet with or without a B-group vitamin mixture for 4 consecutive days, and the B-group vitamin level in a 24-h urine sample was measured for each. The urinary excretion rates for the B-group vitamin in the test diet and the B-group vitamin mixture were calculated from the B-group vitamin intake and the urinary B-group vitamin levels. The ratio of the urinary excretion rate for each B-group vitamin in the test diet to that for the B-group vitamin mixture was determined as the relative availability. The relative availability of vitamin B<sub>1</sub> was 67±20% (mean value±SD and n=6), vitamin B<sub>2</sub> was 64±16%, vitamin B<sub>6</sub> was 73±5%, niacin was 67±19%, and pantothenic acid was 69±11% when the subjects consumed the test diet. This method can be used to simply determine the relative availability of B-group vitamins in food.

(Received October 19, 2007; Accepted in revised form February 2, 2008)

**Keywords:** bioavailability 生体利用率, B-vitamins B群ビタミン, Japanese food 日本食, humans ヒト.

#### 1. 緒 言

食品中のB群ビタミンの多くは遊離型ではなく、いわゆる活性型と称される酵素タンパク質に含まれる補酵素型として存在している。植物性食品では、一部のピロドキシン<sup>1)2)</sup>やニコチン酸<sup>3)4)</sup>はグルコースなどの糖と結合した形で存在している。食品中のB群ビタミンを血管内に取り込むためには、まずタンパク質などの生体高分子と補酵素との結合を切断し、生体高分子から遊離した補酵素を遊離型ビタミンに変換するための消化という過程を必要とする。ビタミンが機能を発揮するためには、血液中から臓器、組織に転送し、再度補酵素にし、補酵素を必要とする酵素タンパク質と結合しなければならない。しかし、摂取したビタミンのどれくらいが消化・吸収され(消化・吸収率)、吸収されたビタミンのどれくらいが臓器・組織に転送

され利用されているか(体内利用率)、ということとはほとんど明らかになっていない<sup>5)</sup>。

2005年版の食事摂取基準<sup>6)</sup>において、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>12</sub>、葉酸の推定平均必要量は各々75%、50%、50%という生体利用率を考慮して策定された。生体利用率とは消化・吸収率と体内利用率を合わせた概念である。推定平均必要量を設定するための実験には遊離型ビタミンを付加して求めた実験が多い<sup>5)</sup>。そのため、遊離型ビタミンを投与して求めた推定平均必要量から通常の食事を摂っているときの推定平均必要量に換算するには、生体利用率を適用する必要がある。

本実験では、一般的な食事(規定食)を女子学生に摂取させ、遊離型B群ビタミンを付加したときとしなかったときの尿中B群ビタミン排泄量を測定することにより、遊離型B群ビタミンに対する規定食中

Table 1. The composition of the diets

	Diet 1	Diet 2	Average
Energy (kcal)	1,708	1,618	1,663
Protein (g)	68.5	61.5	65
Fat (g)	50.8	45.1	48.0
Carbohydrates (g)	236	237	237
Water-soluble vitamins <sup>*1</sup>			
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin chloride)	0.75	0.58	0.67 (1.99 $\mu$ mol)
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.92	0.82	0.87 (2.31 $\mu$ mol)
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	1.24	0.86	1.05 (6.21 $\mu$ mol)
Vitamin B <sub>12</sub> ( $\mu$ g as cyanocobalamin)	7.4	11.3	2.4 (1.77 nmol)
Niacin equivalent <sup>**2</sup> (mg)	30.4	24.8	27.6 (22.6 $\mu$ mol)
Pantothenic acid (mg)	9.3	9.3	9.3 (42.5 $\mu$ mol)
Folates ( $\mu$ g as pteroyl monoglutamic acid)	230	282	256 (580 nmol)
Biotin ( $\mu$ g)	67	53	60 (246 nmol)
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	118	112	115 (65.3 $\mu$ mol)

<sup>\*1</sup> Water-soluble vitamins except for vitamin B<sub>12</sub> were measured. Other nutrients were calculated by using the Standard Tables of Food Composition in Japan.<sup>7)</sup> <sup>\*\*2</sup> The niacin equivalent intake was calculated as follows: the average tryptophan content in food protein is 1.1% and the 1/60 (in weight basis) of tryptophan taken was converted into niacin in the body. The subjects consumed Diet 1 at days 1 and 3, and Diet 2 at days 2 and 4 in each week.

のB群ビタミンの相対利用率を調べた。

## 2. 実験方法

### (1) 被験者

被験者となった女子学生6名は、あらかじめ実験内容の説明を受け、書類にて実験への参加を希望した。いずれも、喫煙、飲酒の習慣がなく、朝食など規則正しい食習慣をもつ者であった。被験者の年齢は21.0 $\pm$ 0.0歳(平均 $\pm$ SD)、身長は161.7 $\pm$ 1.7cm、体重は51.2 $\pm$ 2.8kg、BMIは19.6 $\pm$ 1.2であった。本研究は、滋賀県立大学倫理審査委員会において承認を受け(第30号)、ヘルシンキ宣言の精神に則って行われた。

### (2) 食事

被験者の精神的負担を軽減するため、2種類の食事を1日おきに摂取させた。食事内容は女子学生が食堂

で選択するような一般的なもので、栄養素組成が食事摂取基準の値に近く、2種類の食事の栄養素組成が大きく異なるものを選んだ。具体的には、Diet 1の内容は、朝食は食パン70g、牛乳200g、ミニトマト45g、ハム36g、ゼリー75g、昼食はめし180g、味噌汁(ふ2g、わかめ5g)、小松菜50g、ハンバーグ100g、キャベツ30g、茶130g、夕食はめし250g、カツオ刺身60g、海苔2g、野菜炒め(キャベツ80g、もやし80g、ピーマン30g、にんじん20g)、茶130gである。Diet 2の内容は、朝食は食パン70g、牛乳200g、ミニトマト45g、ハム36g、ゼリー75g、マーガリン8g、昼食はめし180g、ひじき炒め煮(ひじき8g、にんじん4g、枝豆15g)、鶏肉照り焼き80g、キャベツ30g、茶130g、夕食はめし250g、ホタテ刺身90g、海苔2g、野菜炒め(キャベツ80g、もや

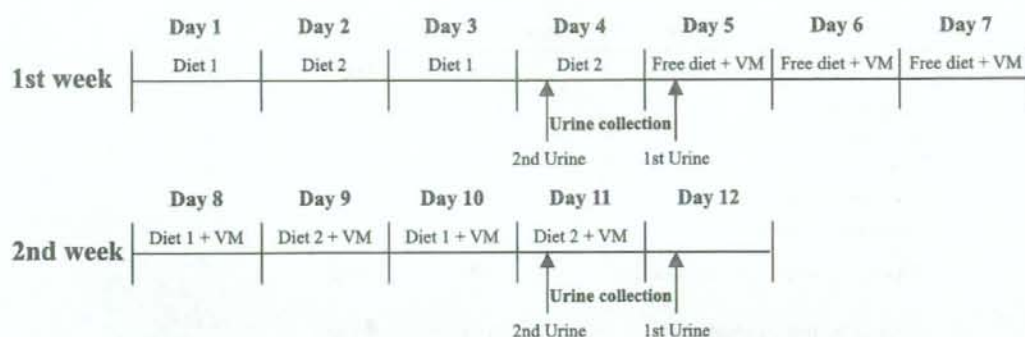


Fig. 1. Experimental design

し 80 g, ビーマン 30 g, にんじん 20 g), 茶 130 g である。その主な栄養素成分を Table 1 に示した。ビタミンB<sub>12</sub>を除く 8 種類の水溶性ビタミンは実測値を用いた。他は五訂日本食品標準成分表<sup>7)</sup>を用いて計算した。

### (3) 実験計画

実験計画の概要を Fig. 1 に示した。実験開始日を実験 1 日とし、実験第 1 日、第 3 日、第 8 日、第 10 日は Diet 1 を、実験第 2 日、第 4 日、第 9 日、第 11 日は Diet 2 を摂取させた。実験第 5 日の採尿終了後から実験第 7 日は自由食とした。実験第 5 日以降は、食事に含まれる B 群ビタミン量とほぼ同量の B 群ビタミン混合を毎食後に摂取させた。B 群ビタミン混合の組成は、チアミン塩酸塩 0.71 mg/日 (2.15 μmol/日)、リボフラビン 0.92 mg/日 (2.15 μmol/日)、ピリドキシン 0.96 mg/日 (5.65 μmol/日)、ニコチンアミド 9.2 mg/日 (75.5 μmol/日)、パントテン酸 4.8 mg/日 (21.9 μmol/日) である。実験第 4 日の 24 時間尿として実験第 4 日の 2 回目の尿から実験第 5 日の 1 回目までの尿を採取した。実験第 11 日の 24 時間尿として、実験第 11 日の 2 回目の尿から実験第 12 日の 1 回目までの尿を採取した。

### (4) 分析方法

尿中のチアミン<sup>8)</sup>、リボフラビン<sup>9)</sup>、ビタミンB<sub>6</sub>代謝産物 4-ピリドキシン酸 (4-PIC)<sup>10)</sup> は HPLC 法により測定した。ニコチンアミド (Nam)<sup>11)</sup>、N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (MNA)<sup>12)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py)<sup>13)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py)<sup>13)</sup> は HPLC 法により測定し、これらの合計を総ニコチンアミド代謝産物とした。パントテン酸<sup>14)</sup> は微生物学的定量法により測定した。

### (5) 相対利用率の計算方法

相対利用率の計算方法の概要を Fig. 2 に示した。規定食摂取時の B 群ビタミン排泄量 (データ 1) を規定食中の B 群ビタミン量で割り、規定食摂取時の B 群ビタミン排泄率を求めた。遊離型 B 群ビタミン付加時の B 群ビタミン排泄量 (データ 2) からデータ 1 を引き、遊離型 B 群ビタミン付加による増加分 (データ 3) を求めた。データ 3 を遊離型 B 群ビタミン量で割り、遊離型 B 群ビタミンの排泄率を求めた。規定食中の B 群ビタミンの相対利用率は、規定食摂取時の B 群ビタミン排泄率を遊離型 B 群ビタミンの排泄率で割って求めた。

### 3. 結果および考察

規定食摂取時の尿中 B 群ビタミン排泄量をデータ 1 とし、規定食に遊離型 B 群ビタミン混合を付加した時の排泄量をデータ 2 とし、Table 2 に示した。遊離型 B 群ビタミン混合付加による増大量 (データ 3) はデータ 1 とデータ 2 の差として求めることができる。従って、データ 3 を遊離型 B 群ビタミン量で割り、遊離型 B 群ビタミンの排泄率を求めた。一方、規定食中の B 群ビタミンの排泄率は、データ 1 を規定食中の B 群ビタミン量で割った値として求めた。遊離型 B 群ビタミン排泄率に対する規定食摂取時の B 群ビタミン排泄率の相対比を、規定食中の B 群ビタミンの相対利用率として求めた (Table 3)。

#### (1) ビタミンB<sub>1</sub>

規定食摂取時のチアミン排泄率は 14.5 ± 3.7% (平均値 ± SD)、遊離型チアミンの排泄率は 22.9 ± 6.4%、遊離型チアミンに対する規定食中のビタミンB<sub>1</sub>の相対利用率は 67 ± 20% であった。相対利用率の最小値は 42%、最大値は 87% であった。

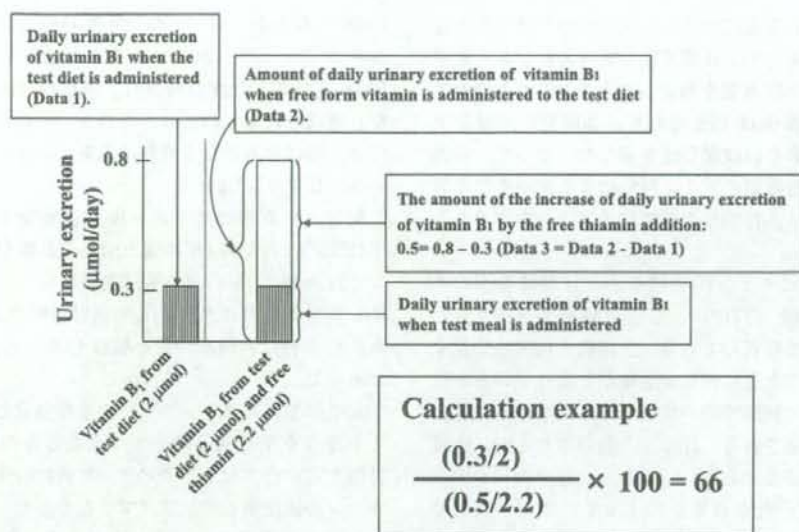


Fig. 2. Calculation example of proposed relative availability determination

Table 2. The comparison of the values between urinary excretions of vitamins when the subjects are fed a diet with or without vitamin mixtures

Vitamins	Data 1 (μmol/day)	Data 2 (μmol/day)	Data 3 (μmol/day)
Thiamin	0.288±0.074	0.780±0.176	0.492±0.149
Riboflavin	0.283±0.073	0.758±0.165	0.475±0.115
Pyridoxine	3.44±0.41	7.78±0.65	4.32±0.26
Nicotinamide	85.6±10.9	131.6±16.6	46.0±15.2
Pantothenic acid	14.6±2.0	25.7±4.9	11.2±3.2

Data 1: The values are urinary excretions of vitamins when only the diet is fed to the subjects. Data 2: The values are urinary excretions of vitamins when the diet and vitamin mixtures are fed to the subjects. Data 3: The values are calculated from "Data 2" - "Data 1." Values are means±SD for 6 subjects.

Table 3. Availability of B-vitamin

Vitamins	Urinary excretion rate for vitamins in the test diet (%)	Urinary excretion rate for free vitamins (%)	Availability (%)
Thiamin	14.5±3.7	22.9±6.4	67±20
Riboflavin	12.2±3.2	19.4±4.8	64±16
Pyridoxine	55.3±6.6	76.4±4.5	73±5
Nicotinamide	37.9±4.8	60.9±21.4	67±19
Pantothenic acid	34.4±4.8	50.9±10.9	69±11

Values are means±SD for 6 subjects.

我々は、女子学生にビタミンフリーの半精製食と遊離型ビタミン混合を7日間連続して与えたときの尿中水溶性ビタミン排泄量を報告した<sup>13)</sup>。このときのチアミンの平均排泄率は19%であり、本研究の遊離型チアミンの排泄率とほぼ同じ値を示した。従って、本実験で得られた遊離型チアミン付加による尿中チアミン排泄量の増大は、付加した遊離型チアミン由来であると考えられる。

生細胞中のビタミンB<sub>1</sub>のほとんどは補酵素型のチアミン二リン酸 (TDP) として、酵素タンパク質と結合した状態で存在している。生細胞を加工して食する状態になったときに何%が遊離型となっているかは不明であるが、補酵素型の状態であるものは多く存在することが推定される。従って、吸収される前に遊離型への消化が必要である。つまり、食品中のビタミンB<sub>1</sub>がどの程度消化されるかによって、生体が利用できるビタミンB<sub>1</sub>の量を吸収できるかが決まる。酵素タンパク質から遊離したTDPは消化管内ではホスファターゼによりピロリン酸がはずれ、遊離型のチアミンとなったのち、吸収されるものと推定されている。しかしながら、この生体利用率を網羅的に検討した報告はみあたらない。

### (2) ビタミンB<sub>2</sub>

規定食摂取時のリボフラビン排泄率は12.2±3.2% (平均値±SD)、遊離型リボフラビンの排泄率は19.4±4.8%、遊離型リボフラビンに対する規定食中のビタミンB<sub>2</sub>の相対利用率は64±16%であった。相対利用率の最小値は41%、最大値は90%であった。

女子学生にビタミンフリーの半精製食と遊離型ビタミン混合を7日間連続して与えたときのリボフラビンの平均排泄率は22%であり、本研究の遊離型チアミンの排泄率とほぼ同じ値を示した<sup>14)</sup>。

生細胞中のリボフラビンは、フラビンアデニンヌクレオチド (FAD) あるいはフラビンモノヌクレオチド (FMN) として補酵素タンパク質に結合している。生細胞を加工して食する状態になったときに何%が遊離型となっているかは不明であるが、補酵素型の状態であるものは多く存在することが推定される。食品中の総リボフラビン含量を測定するときには、食品抽出液を照射することによってリボフラビン、FMN、FADをルミフラビンに分解し、ルミフラビン量を測定する。実際の消化管内では、胃酸環境下で、酵素タンパク質の変性にともないFADは遊離するものと予想される。一部のFADはリン酸がとれて

FMNとなるが、脱リン酸は小腸粘膜の非特異的ピロホスホリラーゼやホスファターゼにより小腸腔内でFMNを経由し加水分解され、遊離のリボフラビンとなり吸収されるものと考えられる。生体利用率については、特に参考となる資料はみあたらない。

### (3) ビタミンB<sub>6</sub>

規定食摂取時のビタミンB<sub>6</sub>代謝産物4-PICの排泄率は55.3±6.6% (平均値±SD)、遊離型ピリドキシンの排泄率は76.4±4.5%、遊離型ピリドキシンに対する規定食中のビタミンB<sub>6</sub>の相対利用率は73±5%であった。相対利用率の最小値は66%、最大値は80%であった。

女子学生にビタミンフリーの半精製食と遊離型ビタミン混合を7日間連続して与えたときのビタミンB<sub>6</sub>に関するデータはないため<sup>15)</sup>、本研究の遊離型ピリドキシンの排泄率との比較はできなかった。

動物の生細胞に含まれるビタミンB<sub>6</sub>の多くは、リン酸化体であるピリドキサルリン酸 (PLP) やピリドキサミンリン酸 (PMP) である。この生細胞を加工して食する状態になったときに何%が遊離型となっているかは不明であるが、補酵素型の状態であるものは多く存在することが推定される。食品中の総ビタミンB<sub>6</sub>量を測定するときには、塩酸酸性下で3時間、オートクレーブすることにより、PLPやPMPのリン酸基を切断して遊離型にし、遊離型の量を測定する。実際の消化管内では、これらは、小腸粘膜のホスファターゼにより遊離のピリドキサル (PL)、ピリドキサミン (PM) になるものと考えられている。一方、植物に含まれるピリドキシン5'-β-グルコシド (PNG) は、消化管内で一部が加水分解を受け、ピリドキシン (PN) を遊離する<sup>2)</sup>。これら遊離のビタミンB<sub>6</sub>は吸収された後PLキナーゼによりリン酸化型に変換されるピリドキシンリン酸 (PNP) と、PMPはさらにPNP/PMPオキシダーゼによりPLPに変換される。PLPは血液中には、アルブミンに結合しておりホスファターゼによる脱リン酸化を免れているが余剰分については脱リン酸化を受けPLとなる。PLはアルデヒドオキシダーゼにより4-PICに変換される。4-PICはビタミンB<sub>6</sub>効力を持たず、排泄されるのみである。PNGの生体利用率は、ヒトにおいては50%と見積もられている<sup>2)</sup>。平均的な米国での食事におけるビタミンB<sub>6</sub>の生体利用率は75%と報告されており、この値が一般的な生体利用率とされている<sup>15)</sup>。本研究で得られた73±5%という値は米国での報告に近いもので

あった。

#### (4) ナイアシン

規定食摂取時の総ニコチンアミド代謝産物排泄率は  $37.9 \pm 4.8\%$  (平均値  $\pm$  SD), 遊離型ニコチンアミドの排泄率は  $60.9 \pm 21.4\%$ , 遊離型ニコチンアミドに対する規定食中のナイアシン当量の相対利用率は  $67 \pm 19\%$  であった。相対利用率の最小値は  $35\%$ , 最大値は  $80\%$  であった。

女子学生にビタミンフリーの半精製食と遊離型ビタミン混合を7日間連続して与えたときの総ニコチンアミド代謝産物の平均排泄率は  $79\%$  であるが、これはナイアシンの供給源のほとんどは半精製食に含まれるトリプトファンに由来するものである<sup>14)</sup>。本研究の遊離型ニコチンアミドの排泄率に近い値を示したが、摂取形態が異なるため直接比較はできない。

ナイアシンは生細胞内では主に補酵素型の NAD (P) として存在するが、細胞の死にともない、急激な速度で分解される。食品として摂取するときには NAD (P) が分解され、動物性食品ではニコチンアミド、植物性食品ではニコチン酸として存在する。食品中の総ナイアシンを測定するときには、食品抽出液を中性条件で10分間、オートクレーブしてニコチンアミドにし、ニコチンアミド量を測定する。実際の消化管内では、食品中に NAD (P) が残っていたとしてもニコチンアミドに分解される。ニコチンアミド、ニコチン酸は小腸で受動拡散によって吸収される。植物性食品中のナイアシンの多くは難消化性の結合型ナイアシンとして存在し、生体利用率が低いことが報告されている<sup>4)</sup>。

#### (5) パントテン酸

規定食摂取時のパントテン酸排泄率は  $34.4 \pm 4.8\%$  (平均値  $\pm$  SD), 遊離型パントテン酸の排泄率は  $50.9 \pm 10.9\%$ , 遊離型パントテン酸に対する規定食中のパントテン酸の相対利用率は  $69 \pm 11\%$  であった。相対利用率の最小値は  $51\%$ , 最大値は  $78\%$  であった。

女子学生にビタミンフリーの半精製食と遊離型ビタミン混合を7日間連続して与えたときのパントテン酸の平均排泄率は  $73\%$  であり、本研究の遊離型パントテン酸の排泄率の1.4倍と近い値を示した<sup>10)</sup>。

生細胞中のパントテン酸の存在形態は遊離型のパントテン酸よりコエンザイム A (CoA) やパンテテイン誘導体のような補酵素型が多い。従って、食事として摂取するパントテン酸は、主として CoA やパンテテイン誘導体の形が多い。食品中の総パントテン酸を測

定するときには、食品抽出液をホスファターゼ・パンテイナーゼ処理を行ったのち、測定する。実際の消化管内でも、ホスファターゼとパンテイナーゼによって、パントテン酸に加水分解された後吸収される。脂質のエネルギー比は  $40\%$  であるが、米国における一般的な食事でのパントテン酸の生体利用率は  $50\%$  程度と報告されている<sup>15)</sup>。しかしながら、日本食におけるパントテン酸の生体利用率に関する報告がみあたらない。本研究で得られた  $69 \pm 11\%$  という値は米国における値よりも高い値であった。

個々の食品に含まれるビタミンの生体利用率を調べた論文を文献検索すると、動物性食品に含まれる B 群ビタミンの利用性は高いが、植物性食品は低い、というものが検索されてくる。たとえば、トウモロコシの「ぬか」に含まれるナイアシン、チアミン、パントテン酸の利用性が「ぬか」の製粉状態により異なる<sup>16)</sup>、食物繊維の存在はビタミン B<sub>6</sub> の吸収を阻害する<sup>17)</sup>、ヨーグルトの摂取はチアミン、リボフラビン、ビタミン B<sub>6</sub> 栄養状態を低下させる傾向がある<sup>18)</sup>、牛乳の摂取が食品中の葉酸の消化・吸収率を高める<sup>19)</sup>、植物食品中にはビタミンと糖類が結合したものの<sup>17)18)</sup>、あるいはタンパク質と結合したものの<sup>20)</sup> が報告されており、これらの結合型ビタミンは消化されにくい、吸収が悪いことが報告されている<sup>21)22)</sup>。さらに、まぐろ、パン、ピーナッツバター中のビタミン B<sub>6</sub> の栄養有効性を相対的に求めた結果、まぐろ中のビタミン B<sub>6</sub> が他の食品よりも高かったという報告もある<sup>23)</sup>。

しかしながら、これらの論文は、著者らが知りたい「習慣的に食べている1日食事由来のビタミンがどの程度我々の体で消化・吸収され、かつ体内で利用されているか」に関する情報、すなわち生体利用率を定量的に与えてくれない。いずれも、定性的な現象を報告しているにすぎない。知りたい情報は、1日に食べた食事由来のビタミンが、①消化、②吸収、③臓器・組織中の細胞内への輸送、④補酵素への合成、⑤アポ酵素との結合、⑥ホロ酵素機能を発揮、⑦ホロ酵素終末、⑧補酵素の分解、⑨遊離ビタミンの異化、⑩尿中への排泄の各過程で、ともに摂取した食品成分がどのような影響を与え、最終的に摂取したビタミンの何%が生体内で機能を発揮することができたのかである。これらの過程を一つずつ調べる技術はない。そこで、現実的な生体利用率を求めるために、遊離型のビタミンの利用性を  $100\%$  とし、食事に含まれるビタミンの利用性を相対利用率として求めることを本論

文では提案した。すなわち、規定食摂取時の尿中ビタミン排泄量と規定食中のビタミン含量を用い、規定食摂取時の尿中ビタミン排泄率を求める。規定食摂取時とビタミン混合付加時の尿中ビタミン排泄量の差から、遊離型ビタミン付加による増大量を求める。この排泄量の増大と付加した遊離型ビタミン量を用い、遊離型ビタミンの尿中ビタミン排泄率を求める。遊離型ビタミンの尿中排泄率に対する規定食摂取時の尿中ビタミン排泄率の相対比を求め、これを規定食に含まれるビタミンの相対利用率とするものである。B群ビタミン供給源として遊離型ビタミンのみを摂取したときの遊離型ビタミン排泄率と本研究の遊離型ビタミン排泄率はほぼ同じ値を示したことから<sup>10)</sup>、本研究の遊離型ビタミン付加による尿中排泄量の増大は付加した遊離型ビタミン由来であると考えられることは妥当である。以上のことから、本論文で提案する相対利用率の決定法は簡便な方法として利用されることが期待される。

#### 4. 結 論

日本人女子学生が一般的な食事を摂取したときのビタミンB<sub>1</sub>の相対利用率は、67±20% (平均値±SD, n=6)、ビタミンB<sub>2</sub>は64±16%、ビタミンB<sub>6</sub>は73±5%、ナイアシンは67±19%、パントテン酸は69±11%であった。

本研究は、平成16年度～18年度厚生労働科学研究費補助金・循環器疾患等総合研究事業・日本人の食事摂取基準(栄養所要量)の策定に関する研究(主任研究者 柴田克己)を受けて行ったものである。関係各位に謝意を表する。

#### 引 用 文 献

- 1) Tadera, K., Kaneko, T., and Yagi, F.: Isolation and Structural Elucidation of Three New Pyridoxine-Glycosides in Rice Bran, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 167-177 (1988)
- 2) Reynolds, R. D.: Bioavailability of Vitamin B-6 from Plant Foods, *Am. J. Clin. Nutr.*, **48**, 863-867 (1988)
- 3) Mason, J. B., and Kodicek, E.: The Metabolism of Niacytin in the Rat. Trigonelline as a Major Metabolite of Niacytin in the Urine, *Biochem. J.*, **120**, 515-521 (1970)
- 4) Das, M. L., and Guha, B. C.: Isolation and Chemical Characterization of Bound Niacin (Niacinogen) in Cereal Grains, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2971-2976 (1960)
- 5) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin,*

*Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*, National Academy Press, Washington DC, 1-40 (1998)

- 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(2004)
- 7) 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—五訂日本標準食品成分表—』(2000)
- 8) Kimura, M., Fujita, T., and Itokawa, Y.: Liquid Chromatographic Determination of the Total Thiamin Content of Blood, *Clin. Chem.*, **28**, 29-31 (1982)
- 9) Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K.: New Metabolites of Riboflavin Appear in Human Urine, *J. Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628 (1983)
- 10) Gregory, J. F. III, and Kirk, J. R.: Determination of Urinary 4-pyridoxic Acid Using High Performance Liquid Chromatography, *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883 (1979)
- 11) Shibata, K., Kawada, T., and Iwai, K.: Simultaneous Micro-Determination of Nicotinamide and Its Major Metabolites, N<sup>1</sup>-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-Methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, **424**, 23-28 (1988)
- 12) Shibata, K.: Ultramicro-Determination of N<sup>1</sup>-Methylnicotinamide in Urine by High-Performance Liquid Chromatography, *Vitamins*, **61**, 599-604 (1987)
- 13) Skeggs, H. R., and Wright, L. D.: The Use of *Lactobacillus arabinosus* in the Microbiological Determination of Pantothenic Acid, *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26 (1944)
- 14) 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.: 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 (2005)
- 15) Tarr, J. B., Tamura, T., and Stokstad, E. L. R.: Availability of Vitamin B<sub>6</sub> and Pantothenate in an Average American Diet in Man, *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 1328-1337 (1981)
- 16) Yu, B. H., and Kies, C.: Niacin, Thiamin, and Pantothenic Acid Bioavailability to Humans from Maize Bran as Affected by Milling and Particle Size, *Plant Foods Hum. Nutr.*, **43**, 87-95 (1993)
- 17) Reynold, R. D.: Bioavailability of Vitamin B-6 from Plant Foods, *Am. J. Clin. Nutr.*, **48**, 863-867 (1988)
- 18) Elmadfa, L., Heinze, C., Majchrzak, D., and Foissy, H.: Influence of a Probiotic Yoghurt on the Status of Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in the Healthy Adult Human,

- An. Nutr. Met.*, **45**, 13-18 (2001)
- 19) Picciano, M. F., West, S. G., Ruch, A. L., Kris-Etherton, P. M., Zhao, G., Johnson, K. E., Maddox, D. H., Fishell, V. K., Dirienzo, D. B., and Tamura, T.: Effect of Cow Milk on Food Folate Bioavailability in Young Women, *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**, 1565-1569 (2004)
  - 20) Kodicek, E., and Wilson, P. W.: The Isolation of Niacytin, the Bound Form of Nicotinic Acid, *Biochem. J.*, **76**, 27-28 (1960)
  - 21) Das, M. L., and Guha, B. C.: Isolation and Chemical Characterization of Bound Niacin (Niacinogen) in Cereal Grains, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2971-2976 (1960)
  - 22) Carter, E. G. A., and Carpenter, K. J.: The Bioavailability for Humans of Bound Niacin from Wheat Bran, *Am. J. Clin. Nutr.*, **36**, 855-861 (1982)
  - 23) Gregory, J. F. III, Trumbò, P. R., Bailey, L. B., Toth, J. P., Baumgartner, T. G., and Cerda, J. J.: Bioavailability of Pyridoxine-5'- $\beta$ -D-glucoside Determined in Humans by Stable-Isotopic Methods, *J. Nutr.*, **121**, 177-186 (1991)
  - 24) Kabir, H., Leklem, J. E., and Miller, L. T.: Comparative Vitamin B-6 Bioavailability from Tuna, Whole Wheat Bread and Peanut Butter in Humans, *J. Nutr.*, **113**, 2412-2420 (1989)



## Urinary Water-Soluble Vitamins and Their Metabolite Contents as Nutritional Markers for Evaluating Vitamin Intakes in Young Japanese Women

Tsutomu FUKUWATARI and Katsumi SHIBATA

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, 2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan

(Received October 30, 2007)

**Summary** Little information is available to estimate water-soluble vitamin intakes from urinary vitamins and their metabolite contents as possible nutritional markers. Determination of the relationships between the oral dose and urinary excretion of water-soluble vitamins in human subjects contributes to finding valid nutrition markers of water-soluble vitamin intakes. Six female Japanese college students were given a standard Japanese diet in the first week, the same diet with a synthesized water-soluble vitamin mixture as a diet with approximately onefold vitamin mixture based on Dietary Reference Intakes (DRIs) for Japanese in the second week, with a threefold vitamin mixture in the third week, and a sixfold mixture in the fourth week. Water-soluble vitamins and their metabolites were measured in the 24-h urine collected each week. All urinary vitamins and their metabolite levels except vitamin B<sub>12</sub> increased linearly in a dose-dependent manner, and highly correlated with vitamin intake ( $r=0.959$  for vitamin B<sub>1</sub>,  $r=0.927$  for vitamin B<sub>2</sub>,  $r=0.965$  for vitamin B<sub>6</sub>,  $r=0.957$  for niacin,  $r=0.934$  for pantothenic acid,  $r=0.907$  for folic acid,  $r=0.962$  for biotin, and  $r=0.952$  for vitamin C). These results suggest that measuring urinary water-soluble vitamins and their metabolite levels can be used as good nutritional markers for assessing vitamin intakes.

**Key Words** biomarker, human, urine, vitamin

A nutritional marker can be an indicator of nutritional status with respect to intake or metabolism of dietary constituents. Nutritional markers can be designated into one or more of three categories, 1) a means of validation of dietary instruments, 2) surrogate indicators of dietary intakes, or 3) integrated measures of nutritional status for a nutrient (1). Nutritional markers may be interpreted more broadly as a biological consequence of dietary intake or dietary patterns, and contribute to setting recommendations, tolerable levels and guidelines. Recent validation studies have developed the urinary compounds as nutritional markers to estimate nutrient intakes. For example, 24-h urinary nitrogen has been established as a marker for protein intake (2), the same as urinary potassium for energy and potassium intake (3), and urinary sugars for sugar intake (4).

Water-soluble vitamins are absorbed from the digestive tract after ingestion, stored in the liver, delivered to peripheral sites and then excreted to urine. Urinary water-soluble vitamins or their metabolites decrease markedly as vitamin status declines, and they are affected by recent dietary intake. Urinary excretion of water-soluble vitamins such as thiamin, riboflavin and niacin has been used for setting Dietary Reference Intakes (DRIs) in the USA and Japan (5, 6). However, only a single study investigated urinary vitamins as a possible marker for intake. Individuals' 30-d means of

thiamin intake are highly correlated with their mean 24-h urine thiamin levels under strictly controlled conditions, showing 24-h urinary thiamin as a useful marker for thiamin intake under strictly controlled conditions (7). Although pharmacological doses of water-soluble vitamin intake such as vitamin B<sub>2</sub> (8), nicotinamide (9) and biotin (10) dramatically increase urinary vitamin levels, few studies have investigated the relationship between several oral doses and dietary intake and urinary excretion of vitamin C, to the best of our knowledge (11, 12).

To determine whether urinary levels of water-soluble vitamins and their metabolites can be used as possible markers for estimating their intakes, six female Japanese college students were given a standard Japanese diet with or without a 1-, 3- and 6-fold vitamin mixture based on Dietary Reference Intakes (DRIs) for Japanese. The 24-h urinary excretion of water-soluble vitamins and their metabolites was measured, and the relationships between vitamin oral dose and urinary excretion were determined. This is the first report clearly to show that 24-h urinary vitamins and their metabolite levels were correlated to their intakes, and can be used as nutritional markers for their intakes.

### SUBJECTS AND METHODS

**Subjects.** Six healthy female Japanese college students participated in the present experiment. They did not have regular use of medications or dietary supple-

E-mail: fukkie@shc.usp.ac.jp

Table 1. The composition of the diets.

	Diet 1	Diet 2	Average	RDA <sup>3</sup>
Energy (kcal)	1,708	1,618	1,663	1,750
Protein (g)	68.5	61.5	65	50
Fat (g)	50.8	45.1	48.0	40-50
Carbohydrates (g)	236	237	237	—
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.59	0.46	0.53 (2.0 μmol)	0.74
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.92	0.82	0.87 (2.3 μmol)	1.05
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	1.24	0.86	1.05 (6.2 μmol)	1.15
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	7.4	11.3	2.4 (1.77 nmol)	2.4
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	30.4	24.8	27.6 (226 μmol)	10.2
Pantothenic acid (mg)	9.3	9.3	9.3 (42 μmol)	5
Folates (μg as pteroyl monoglutamic acid)	230	282	256 (0.58 μmol)	200
Biotin (μg)	67	53	60 (246 nmol)	30
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	118	112	115 (0.65 mmol)	100

<sup>1</sup>Water-soluble vitamins except for vitamin B<sub>12</sub> are measured. Other nutrients are calculated by using the Standard Tables of Food Composition in Japan (15).

<sup>2</sup>The niacin equivalent intake was calculated as follows: the average tryptophan content in food protein is 1.1% and the 1/60 (on a weight basis) of tryptophan taken was converted into niacin in the body.

<sup>3</sup>The Recommended Dietary Allowance (RDA) for vitamin B<sub>1</sub> is 0.42 mg/1,000 kcal as thiamin, vitamin B<sub>2</sub> is 0.60 mg/1,000 kcal, vitamin B<sub>6</sub> is 0.023 mg/g protein, niacin is 5.8 mg NE/1,000 kcal, folic acid is 240 μg/d and vitamin C is 100 mg/d for Japanese adults, and the Adequate Intake for pantothenic acid is 5 mg/d and biotin is 45 μg/d for Japanese adult women (6).

The subjects consumed Diet 1 on days 1 and 3 each week, and Diet 2 on days 2 and 4.

ments, or habitual alcohol or cigarette consumption. Their age, body weight, height and body mass index (mean±SD) are 21.0±0.0 y old, 161.7±1.7 cm, 51.2±2.8 kg and 19.6±1.2, respectively. This study was reviewed and approved by The Ethical Committee of the National Institute of Health and Nutrition (Tokyo, Japan).

**Chemicals.** Thiamin hydrochloride, riboflavin, pyridoxine hydrochloride, nicotinamide, calcium pantothenate, pteroylmonoglutamic acid (folic acid), D(+)-biotin, L(+)-ascorbic acid were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). 4-Pyridoxic acid (4-PIC) was manufactured by ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, CA, USA) and obtained through Wako Pure Chemical Industries. N<sup>1</sup>-Methylnicotinamide (MNA) chloride was purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan). N<sup>1</sup>-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-Py) and N<sup>1</sup>-methyl-4-pyridone-3-carboxamide (4-Py) were synthesized (13, 14). All the other chemicals used were of the highest purity available from commercial sources.

**Diet.** Two kinds of meals were given to the subjects. Diet 1 consisted of bread, margarine, ham, tomato, jelly and milk as breakfast; rice, miso-soup, Hamburg steak, cabbage, boiled spinach and Japanese tea as lunch; and

rice, raw skipjack, laver, pan-fried vegetables and Japanese tea as dinner. Diet 2 consisted of bread, margarine, ham, tomato, jelly and milk as breakfast; rice, miso-soup, broiled chicken, cabbage, simmered hijiki and Japanese tea as lunch; and rice, raw scallop, laver, pan-fried vegetables and Japanese tea as dinner. The nutrient elements are shown in Table 1. The subjects consumed Diet 1 on days 4 and 6 in each week, and Diet 2 on days 5 and 7. Water-soluble vitamins, except for vitamin B<sub>12</sub>, in the diets were measured by the procedures described in *Determination of vitamins and their metabolites in urine and diets*. Other nutrients were calculated by using the Standard Tables of Food Composition in Japan (15).

**Experimental design.** The subjects took the diet freely on days 1 to 3, and took the diet shown in Table 2 on days 4 to 7 in each week. Approximately 1, 3- and 6-fold of the synthesized water-soluble vitamin mixture as vitamin mixture A, B and C shown in Dietary Reference Intakes for Japanese, 2005, were made (Table 2) (6). The subjects did not take any vitamin mixture in the first week, and then took the vitamin mixture A in the second week, the vitamin mixture B in the third week, and the vitamin mixture C in the fourth week. One third of the dose was put into a small gelatinous cap-

Table 2. The vitamin contents in the vitamin mixtures for 3 capsules per day.

	V. mix. A	V. mix. B	V. mix. C
Thiamin	0.56 mg/d (2.1 $\mu$ mol/d)	1.78 mg/d (6.7 $\mu$ mol/d)	3.89 mg/d (14.7 $\mu$ mol/d)
Riboflavin	0.92 mg/d (2.4 $\mu$ mol/d)	2.95 mg/d (7.8 $\mu$ mol/d)	5.74 mg/d (15.3 $\mu$ mol/d)
Pyridoxine	0.96 mg/d (5.7 $\mu$ mol/d)	3.21 mg/d (19.0 $\mu$ mol/d)	6.61 mg/d (39.1 $\mu$ mol/d)
Nicotinamide	9.2 mg/d (75 $\mu$ mol/d)	36.4 mg/d (298 $\mu$ mol/d)	67.4 mg/d (552 $\mu$ mol/d)
Pantothenic acid	4.8 mg/d (22 $\mu$ mol/d)	15.0 mg/d (68 $\mu$ mol/d)	31.4 mg/d (143 $\mu$ mol/d)
Pteroylmonoglutamic acid	205 $\mu$ g/d (0.46 $\mu$ mol/d)	530 $\mu$ g/d (1.20 $\mu$ mol/d)	1,340 $\mu$ g/d (3.04 $\mu$ mol/d)
Biotin	26 $\mu$ g/d (107 nmol/d)	84 $\mu$ g/d (344 nmol/d)	182 $\mu$ g/d (746 nmol/d)
L-Ascorbic acid	98 mg/d (0.56 mmol/d)	296 mg/d (1.68 mmol/d)	600 mg/d (3.41 mmol/d)

sule, and the capsule was administered three times daily after breakfast, lunch and dinner. The 24-h urine samples were collected from the second urinary sample on the last day to the first sample on the next day in each week. The urine sample volumes were measured, and the samples were immediately treated as described below, to avoid destruction of water-soluble vitamins and their metabolites, and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until needed.

**Determination of vitamins and their metabolites in urine and diets.** For analysis of urinary thiamin, riboflavin, 4-PIC, MNA, 2-Py and 4-Py, 1 mL of 1 mol/L HCl was added to 9 mL urine. For analysis of urinary pantothenic acid and biotin, urine samples were not treated. For analysis of urinary folic acid, 1 mL of 1 mol/L-ascorbic acid was added to 9 mL urine. For analysis of urinary ascorbic acid, 4 mL of 10% metaphosphate was added to 4 mL urine. Urinary thiamin was determined by the HPLC-post labeled fluorescence method (16). Urinary riboflavin was determined by the HPLC method (17). Urinary 4-PIC was determined by the HPLC method (18). Urinary 2-Py, 4-Py and MNA, nicotinamide metabolites, were determined by the HPLC method (13, 19). Urinary pantothenic acid was determined by the microbioassay method using *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (20). Urinary folic acid was determined by the microbioassay method using *Lactobacillus casei* ATCC 2733 (21). Urinary biotin was determined by the microbioassay method using *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (22). Urinary reduced and oxidized ascorbic acid, and 2,3-diketogluconic acid, were determined by the HPLC method (23).

For analysis of water-soluble vitamins in the diets, Diet 1 and 2 were homogenized in water. Vitamin B<sub>1</sub> as sum of thiamin, TMP, TDP and TTP in the diets was determined by the HPLC-post labeled fluorescence method (16). Riboflavin, FMN and FAD in the diets were converted to lumiflavin by photolysis, and then determined by the HPLC method (17). Vitamin B<sub>6</sub> vitamers in the diets was converted to pyridoxine by autoclave

under acidic condition, and total pyridoxine was determined by the microbioassay method using *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 (24). NAD and NADP in the diets were converted to nicotinamide by autoclave, and total nicotinamide was determined by the HPLC method (13). Bound pantothenic acid such as CoA and pantetheine in the diets was digested to free form by alkaline phosphatase and pigeon liver amidase, and total pantothenic acid was determined by the microbioassay method using *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (20). Foliates in the diets were digested to pteroylmonoglutamic acid by conjugase and protease, and pteroylmonoglutamic acid as total folic acid was determined by the microbioassay method using *Lactobacillus casei* ATCC 2733 (21). Bound biotin in the diet was converted to free form by autoclave under acidic conditions, and total biotin was determined by the microbioassay method using *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (22). Reduced and oxidized ascorbic acid, and 2,3-diketogluconic acid in the diets were determined by the HPLC method (23).

**Statistical analysis.** Linear regression analysis was carried out using a computer program, GraphPad Prism version 4.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA 92130, USA). Correlation coefficients were calculated using the method of Pearson product-moment correlation coefficient. The significance of the linear correlation coefficient was tested using Fisher's transformation test.

## RESULTS

### Vitamin B<sub>1</sub>

The urinary excretion of thiamin in the first week was  $0.288 \pm 0.074 \mu\text{mol/d}$  to  $0.53 \text{ mg/d}$  ( $2.0 \mu\text{mol/d}$ ) of thiamin intake (mean  $\pm$  SD,  $n=6$ ), and the level increased linearly until the fourth week taking  $4.42 \text{ mg/d}$  ( $22.4 \mu\text{mol/d}$ ) (Fig. 1A). The correlation between urinary and oral thiamin was significantly high ( $y=0.281x-0.514$ ,  $r=0.959$ ;  $p<0.0001$ ). The urinary recovery of thiamin (mean  $\pm$  SD,  $n=6$ ) was

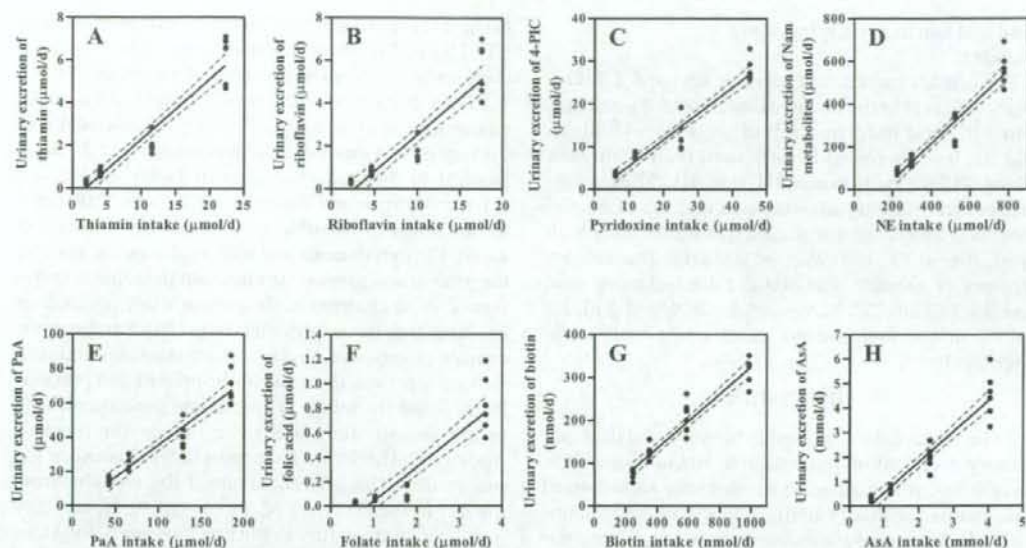


Fig. 1. Regression and 95% CI of oral dose and urinary excretion of vitamin B<sub>1</sub> (A), vitamin B<sub>2</sub> (B), vitamin B<sub>6</sub> (C), niacin (D), pantothenic acid (E), folate (F), biotin (G) and vitamin C (H). Values are individual points of six subjects in each dose. 4-PIC signifies 4-pyridoxic acid, a catabolite of vitamin B<sub>6</sub> vitamers, and the Nam metabolites signify the total amount of nicotinamide metabolites, MNA, 2-Py and 4-Py.

14.4±3.7, 19.0±4.3, 17.6±3.6 and 27.2±4.7% in the first, second, third and fourth week, respectively.

#### Vitamin B<sub>2</sub>

The urinary excretion of riboflavin in the first week was 0.283±0.073 μmol/d to 0.87 mg/d (2.3 μmol/d) of riboflavin intake, and the level increased linearly until the fourth week taking 6.61 mg/d (17.6 μmol/d) (Fig. 1B). The correlation between urinary and oral riboflavin was significantly high ( $y=0.342x-0.901$ ,  $r=0.926$ ;  $p<0.0001$ ). The urinary recovery of riboflavin was 12.3±3.2, 16.1±3.5, 16.4±5.0 and 31.6±6.9% in the first, second, third and fourth week, respectively.

#### Vitamin B<sub>6</sub>

The urinary excretion of 4-PIC, a metabolite of vitamin B<sub>6</sub>, in the first week was 3.44±0.41 μmol/d to 1.05 mg/d (6.2 μmol/d) of pyridoxine intake, and the level increased linearly until the fourth week taking 7.66 mg/d (45.2 μmol/d) (Fig. 1C). The correlation between urinary 4-PIC and oral pyridoxine was significantly high ( $y=0.611x-0.59$ ,  $r=0.966$ ;  $p<0.0001$ ). The urinary recovery of 4-PIC was 55.4±6.6, 65.1±5.5, 49.9±14.3 and 61.9±5.9% in the first, second, third and fourth week, respectively.

#### Niacin

The urinary excretion of nicotinamide metabolites in the first week was 85.6±10.8 μmol/d to 27.6 mg niacin equivalents (NE)/d (226 μmol/d) of niacin intake, and the level increased linearly until the fourth week taking 95.0 mg NE/d (779 μmol/d) (Fig. 1D). The correlation between urinary nicotinamide metabolites and oral niacin was significantly high ( $y=0.852x-125.9$ ,  $r=0.957$ ;  $p<0.0001$ ). The urinary recovery of nicotin-

amide metabolites was 37.9±4.8, 43.6±6.2, 53.4±13.6 and 71.9±10.1% in the first, second, third and fourth week, respectively.

#### Pantothenic acid

The urinary excretion of pantothenic acid in the first week was 14.6±2.0 μmol/d to 9.3 mg/d (42 μmol/d) of pantothenic acid intake, and the level increased linearly until the fourth week taking 40.7 mg/d (186 μmol/d) (Fig. 1E). The correlation between urinary and oral pantothenic acid was significantly high ( $y=0.378x-1.6$ ,  $r=0.951$ ;  $p<0.0001$ ). The urinary recovery of pantothenic acid was 34.4±4.8, 39.1±6.1, 30.5±6.7 and 38.4±5.9% in the first, second, third and fourth week, respectively.

#### Folate

The urinary excretion of folic acid in the first week was 0.022±0.009 μmol/d to 256 μg/d (0.58 μmol/d) of folate intake, and the level increased linearly until the fourth week taking 1.60 mg/d (3.62 μmol/d) (Fig. 1F). The correlation between urinary folic acid and oral folate was significantly high ( $y=0.277x-0.235$ ,  $r=0.907$ ;  $p<0.0001$ ). The urinary recovery of folic acid was 3.8±1.5, 5.1±1.5, 5.5±3.3 and 22.9±6.5% in the first, second, third and fourth week, respectively.

#### Biotin

The urinary excretion of biotin in the first week was 74.5±12.0 nmol/d to 60 μg/d (246 nmol/d) of biotin intake, and the level increased linearly until the fourth week taking 242 μg/d (990 nmol/d) (Fig. 1G). The correlation between urinary and oral biotin was significantly high ( $y=0.316x+8.2$ ,  $r=0.962$ ;  $p<0.0001$ ). The urinary recovery of biotin was 30.3±4.9, 35.6±4.8, 35.1±6.4 and 31.8±3.0% in the first, second,