

含有するバナジウムサプリメントが開発され、糖尿病患者への投与が行われるようになった<sup>4)</sup>。しかし、この場合の投与量は、100 mg/日をこえる薬理レベルであり、米国の食事摂取基準が定める上限値 (1.8 mg/日) を大幅にこえるものであった。

このようにバナジウムは生体内において一定の生理機能を持つことは明らかであるが、日常の食生活におけるバナジウム摂取についての情報はきわめて少ない。わが国の食品に関して公開されている「食品の微量元素含量表」においては、バナジウムは対象元素になっているが、ほとんどの食品が0 (1  $\mu\text{g}/100\text{ g} = 10\text{ ng/g}$ 未満) と記載されている<sup>5)</sup>。食品のバナジウム濃度を測定し、バナジウム摂取量を推定することは、バナジウムの必須性を検討する実験におけるバナジウム欠乏食を作成するために必須の情報と思われる。そこで本研究では、代表的な食品、および飲料水のバナジウム濃度を測定し、日本人のバナジウム摂取量の推定を試みた。

## 実験方法

### 1. バナジウム測定用の試料

#### 1) 飲料水の収集

2006年8月に大阪、和歌山、および沖縄県下において、水道水をポリエチレン製の広口びんに採取し、バナジウム測定用試料とした。一方、2006年8～11月にかけて、採水地が明らかな国産ミネラルウォーター19試料および外国産ミネラルウォーター27試料を大阪市内の複数の小売店、または複数の通信販売から購入し、測定用試料とした。収集した飲料水試料は、測定までの間、4℃で保存した。

#### 2) 食品試料の収集

2006年8～11月にかけて、大阪市内の複数の小売店から、種々の生鮮および加工食品を購入し、測定用試料とした。また、2004年に東京農業大学短期大学の館 博教授から供与を受けた玄麦も測定用試料とした。収集した食品試料は、すみやかにそのバナジウム含量を測定した。

### 2. バナジウムの分析

飲料水は、内部標準として最終濃度50 ng/mLのスカンジウム (Sc) を添加後、直接、誘導結合プラズマ質量分析器 (ICPMS) に噴霧し、質量数51の強度を測定することによって、バナジウムを定量した。

各食品1～9 gを精秤し、電気炉中550℃で16時間灰化した。灰化試料は1 Mの硝酸に溶解後、飲料水と同様に、Scを内部標準として、ICPMSでバナジウムを定量した。

## 結 果

### 1. 分析精度の確認

NIST標準試料のrice flour (SRM 1568a, バナジウム濃度7 ng/g), wheat flour (SRM 1567a, 同11 ng/g), apple leaves (SRM 1515, 同 $0.26 \pm 0.03\ \mu\text{g/g}$ ), whole egg powder (RM 8415, 同 $0.459 \pm 0.081\ \mu\text{g/g}$ ) をそれぞれ0.9～1.1 gを精秤して、550℃で灰化後、1 M硝酸に溶解し、ICPMSでバナジウム濃度を測定した結果 (平均 $\pm$ SD, n = 4, ng/g) は、以下のとおりであった。Rice flour,  $9 \pm 2$ ; wheat flour,  $14 \pm 4$ ; apple leaves,  $204 \pm 45$ ; whole egg powder,  $441 \pm 65$ 。

一方、大阪府下の水道水 (バナジウム濃度の実測値,  $3 \pm 1\text{ ng/mL}$ ) に1 ng/mLの標準バナジウムを添加した試料のバナジウム濃度の実測値は $4 \pm 1\text{ ng/mL}$  (平均 $\pm$ SD, n = 4) であった。

### 2. 飲料水中のバナジウム濃度

Table 1に飲料水のバナジウム濃度の測定結果をまとめた。水道水3試料はいずれも5 ng/mL未満のバナジウム濃度であった。ミネラルウォーターの場合も、国産と外国産をあわせて46試料中31試料 (67.4%) は5 ng/mL未満の低バナジウム濃度であった。これに対して、10 ng/mL以上のバナジウム濃度を示したのは、国産ミネラルウォーター19試料中6試料、欧州産ミネラルウォーター21試料中1試料、北米産ミネラルウォーター6試料中1試料に過ぎなかった。また、

**Table 1** Vanadium contents in drinking water

Samples	Number of samples	Vanadium content (ng/mL)				Distribution of vanadium content <sup>a)</sup> (number of samples)				
		Mean	GM <sup>b)</sup>	Median	Range	< 5	5-10	10-20	20-50	≥ 50
Japanese tap water <sup>c)</sup>	3	3	3	3	3-4	3	0	0	0	0
Japanese mineral water	19	15	6	5	< 1-92	8	5	2	2	2
European mineral water	21	4	3	3	1-12	15	5	1	0	0
North American mineral water	6	11	2	2	1-57	5	0	0	0	1

<sup>a)</sup> A unit of vanadium content is ng/mL.

<sup>b)</sup> Geometrical mean.

<sup>c)</sup> Samples of Japanese tap water were collected in Osaka, Wakayama and Okinawa Prefectures.

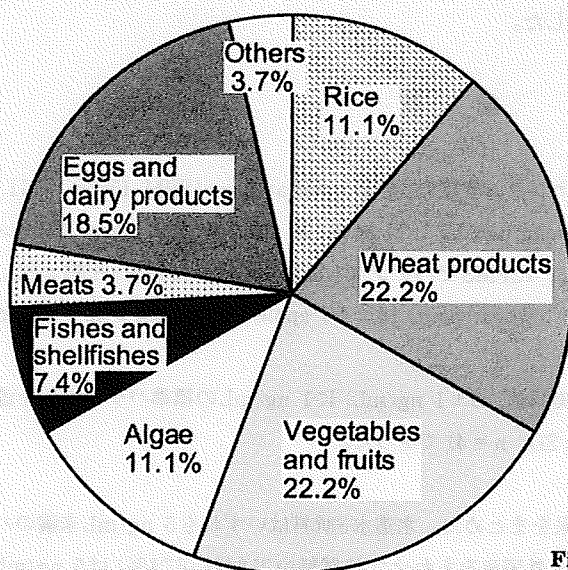
50 ng/mLをこえる高バナジウム濃度を示したのは、国産ミネラルウォーターでは富士山麓産「朝霧の水」と「バナジウム天然水」の2試料、外国産ミネラルウォーターでは米国カリフォルニア州北端のシヤスタ山麓産「Crystal Gyzar」の1試料であった。

### 3. 食品中のバナジウム濃度

Table 2に、測定した食品のバナジウム濃度をまとめた。なお、測定は食パンを除き、1食品1試料に対して実施した。乾燥重量当たりで比較した場合、1000 ng/gをこえるバナジウムが検出されたのは、海藻類（コンブとヒジキ）と貝類（アサリとシジミ）であった。しかし、魚肉のバナジウム濃度はあまり高くなかった。畜産物の中では、牛乳のバナジウム濃度が比較的高かったが、卵や肉類のバナジウム濃度は乾燥重量当たりでも100 ng/g未満だった。植物食品の中では、レタスなどの葉野菜に比較的高濃度のバナジウムが検出されたが、果実、イモ、豆、および穀物類のバナジウム濃度は乾燥重量当たりでも50 ng/g未満の低値だった。ただし穀物製品の中で、食パンには、玄麦や小麦粉のバナジウム濃度が精白米や大豆と同様に低値であるにもかかわらず、比較的高濃度のバナジウムが検出された。

### 4. 日本人のバナジウム摂取量の推定

食品中バナジウム濃度の測定結果と平成12年厚生労働省国民栄養調査結果<sup>6)</sup>をもとに、日本人の食品からのバナジウム摂取量を算定したところ、日本人1人当たりのバナジウム摂取量は27 µg/日であると推定された。Fig. 1に、日本



**Fig. 1** Contribution of each food group to vanadium intake in Japanese.

Total intake: 27 µg/d/capita

Table 2 Vanadium contents in various foods

Foods	Vanadium content (ng/g)	
	Fresh basis	Dry basis
Cereals		
Polished rice	16	19
Whole wheat, hard, domestic	15	17
Whole wheat, hard, USA <sup>a)</sup>	20	20
Wheat flour, hard	< 1	< 1
White table bread	132 <sup>b)</sup>	212 <sup>b)</sup>
Potatoes		
Sweet potato	13	37
Potato	4	21
Soybean, dried, domestic	1	2
Vegetables		
Japanese radish ( <i>Daikon</i> )	7	128
Carrot	10	93
Cabbage	17	236
Lettuce	37	902
Spinach	25	329
Fruits		
Apple	< 1	< 1
Satsuma mandarin	< 1	< 1
Banana	5	22
Algae		
<i>Hijiki</i> , boiled and dried ( <i>Hizikia fusiformis</i> )	1061	1228
<i>Kombu</i> , dried ( <i>Laminaria</i> spp.)	1157	1278
<i>Mozuku</i> , salted, desalted ( <i>Nemacystus decipiens</i> )	30	904
<i>Wakame</i> , blanched, salted, desalted ( <i>Undaria pinnatifida</i> )	21	240
Fishes and shellfishes		
Mackerel	11	31
Horse mackerel	15	47
Salmon	30	105
Squid	22	135
Short-necked clams	148	1526
Freshwater clams	194	1659
Meats		
Beef, lean	8	22
Pork, lean	21	74
Chicken, breast without skin	17	61
Hen's egg, whole	10	42
Dairy products		
Cow's milk	33	260
Skin milk, dried	392	407

<sup>a)</sup> Dark northern spring (DNS).

<sup>b)</sup> Mean value of 3 samples.

人のバナジウム摂取に及ぼす各食品群の寄与を表した。バナジウム摂取への寄与が比較的大きい食品群は、小麦製品、野菜、および乳製品であると考えられた。海藻や貝類は、バナジウム含量は高いが、摂取量が少ないため、バナジウム供給源としての地位は高くなかった。

## 考 察

ICPMSによって標準参照試料を分析したところ、いずれの試料の測定値も保証値の範囲内にあった。また、飲料水を対象としたバナジウムの添加回収試験結果も満足のいくものであった。以上のことから、本実験におけるバナジウムの測定値は、十分に信頼できるものと判断できる。

水道水とミネラルウォーターを分析したところ、3分の2の試料が5 ng/mL未満のバナジウム濃度を示した。とくに水道水3試料のバナジウム濃度はいずれも5 ng/mL未満であった。以上のことから、特殊なミネラルウォーターを飲用し続けられない限り、飲料水からのバナジウム摂取はきわめて微量であると判断できる。

特異的に50 ng/mLをこえる高バナジウム濃度を示したミネラルウォーターは富士山麓および、米国のシャスタ山山

麓で採取されたものであった。また、これら以外に20 ng/mL前後の比較的高いバナジウム濃度を示したのは、大分県日田市、および北海道黒松内で採取されたミネラルウォーターであった。これらの高バナジウム濃度のミネラルウォーターが採取された地域は、いずれも火成岩からなる地質の地域である。一方、ほとんどの試料が5 ng/mL未満の低バナジウム濃度を示した欧州産ミネラルウォーターは、産地国は様々であるが、そのほとんどがアルプス山脈内の湧水に起源を持つものであった。また、石灰岩の鍾乳洞である岩手県龍泉洞で採取されたミネラルウォーターは、全試料中最低の1 ng/mL未満のバナジウム濃度だった。これらのことから、火山地帯で採取されるミネラルウォーターは、堆積岩地質に比較して、高バナジウム濃度を示す可能性が考えられた。しかし、火山地帯で採取されたものであっても、バナジウム濃度が低い試料も多いことから、火成岩地質であることだけで高バナジウム濃度になるとはいいきれないと思われる。

コンブなどの海藻類には、乾燥重量当たり1000 ng/gをこえる高バナジウム濃度を認めた。また、植物食品の中で、レタスなどの葉野菜には、果実や穀物に比較してかなり高濃度のバナジウムが検出された。これらのことから、海水や土壌中に含有されるバナジウムは、海藻や陸上植物に容易に吸収され、海藻本体や葉に蓄積すると思われる。しかし、果実、いも、穀物のバナジウム濃度が低いことから、葉にとりこまれたバナジウムは、それ以上、植物体内を移動しないと考えられる。また、貝類は、海藻類と同程度の高バナジウム濃度を示した。貝類が高バナジウム濃度の藻類や植物プランクトンを摂取後、中腸腺などの消化器官にバナジウムを蓄積した可能性は高いと思われる。ただし、同じ水産物でも魚肉やイカ肉にはバナジウムの蓄積が認められなかったことから、消化器官から可食部である筋肉へのバナジウムの移行はわずかと考えられる。一方、畜産物では、畜肉や鶏卵のバナジウム濃度が低かったのに対して、牛乳には高濃度のバナジウムが認められた。以上のことから、牧草などの動物飼料に含まれるバナジウムは、吸収後、血漿を介して乳汁には移行するが、筋肉をはじめとする臓器には蓄積しないと推定できる。

食パンにも高濃度のバナジウムが検出された。原料のDNS小麦や強力粉のバナジウム濃度はきわめて低いことから、食パン製造工程において、バナジウムの混入が生じていると判断できる。ただし現段階では、バナジウム混入プロセスの特定にはいたっていない。

公刊されている「食品の微量元素含量表」<sup>5)</sup>と比較すると、今回の測定値は、海藻類と貝類の数値においてはオーダー的にはほぼ等しいものであった。しかし、葉野菜、乳製品、食パンなど「含量表」においてゼロ表示(10 ng/g未満)の食品に関しても、今回の測定は一定の数値を与えることができた。「含量表」の数値は、ICPMSの多元素同時測定によって得られたものであるが、標準参照試料による測定法の精度確認が行われていないことから、目安程度のもものと認識すべきであろう。

今回の食品のバナジウム分析値と国民栄養調査成績<sup>6)</sup>をもとに、日本人1人当たりの平均的なバナジウム摂取量を算定すると27 µg/日という数値が得られた。水道水に3 ng/mL程度のバナジウムが含有されることを考慮すると、日本人のバナジウム摂取量は約30 µg/日と見積もるのが適切と判断できる。高バナジウム濃度の食品は海藻類と貝類であるが、これらは日常的に摂取するものではないため、バナジウム供給源としては大きくない。実際にバナジウム供給源として寄与が大きいのは、小麦製品、野菜および乳製品であると推定できた。試算したバナジウム摂取量の数値は、米国で報告されている数値(6~18 µg/日)<sup>7)</sup>よりもやや高い。日本人のバナジウム摂取量が米国人に比較して高いのは、日本人の海藻、貝類、葉野菜の摂取が米国人よりも多いためと考えられる。バナジウムは必須ミネラルではないため、わが国の食事摂取基準には取り上げられていない。一方、米国の食事摂取基準では、成人に対する摂取上限値のみが1.8 mg/日に設定されている<sup>4)</sup>。今回推定した日本人の摂取量はこれを大幅に下回っており、現在の日本人のバナジウム摂取量は適正な範囲にあると推定できる。ただし、今回の推定は、食品の分析数が少ないので、あくまでも予備的なものと位置付ける必要がある。今後、食品の分析例を増やし、より厳密な摂取量の推定を行う予定である。

なお、ミネラルウォーター中で、「朝霧の水」はバナジウム濃度が最大(92 ng/mL)であった。しかし、このミネラルウォーターを1日に2 L飲用したとしても、バナジウム摂取量は200 µg/日であり、米国食事摂取基準の上限値を大幅に下回る。したがって、高バナジウム濃度のミネラルウォーターを日常的に飲用しても、健康上問題は生じないと判断



できる。

最後に、今回の摂取量推定をもとに、動物実験におけるバナジウム欠乏食について考察をこころみる。今回算定した日本人の平均的なバナジウム摂取量は約30 µg/日であった。成人1人が摂取する食事量を乾燥重量に換算して約500 g/日とすれば、食事中バナジウムの平均濃度は約0.06 µg/gということになる。したがって、ラットなどのげっ歯類を用いる場合のバナジウム欠乏食は、これよりも相当低いバナジウム濃度に設定する必要がある。

Nielsenはバナジウムなどの超微量元素の関する栄養実験を行う場合には慎重な飼料設計が必要であると述べている<sup>8)</sup>。したがって、バナジウム欠乏食の調製にあたっては、バナジウム混入の確率が低い原料を選択しなければならない。カゼインは、動物栄養実験においてもっとも汎用されるタンパク質源であるが、牛乳中のバナジウム濃度が乾燥重量あたりで0.2 µg/gをこえる高値であることから、バナジウム欠乏食を作成する場合には不適切である可能性が高い。これに対して、穀物や豆類のバナジウム濃度は乾燥重量当たりでも50 ng/g未満の低値である。したがって、今回はバナジウム濃度を測定していないが、大豆分離タンパク質や小麦グルテンは、バナジウムをほとんど含まないタンパク質源として、バナジウム欠乏食の調製に利用できると思われる。

本研究は、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(主任研究者 柴田克己))を受けて行ったものである。

#### 参考文献

- 1) Nielsen FH (1987) Vanadium. in Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 5th ed. vol. 1, ed. by Mertz W, Academic Press, New York: pp. 275-300.
- 2) Nielsen FH (1984) Ultratrace elements in nutrition. Ann Rev Nutr 4: 21-41.
- 3) Heyliger CE, Tahiliani AG, McNeill JH (1985) Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. Science 227: 1474-1477.
- 4) Institute of Medicine (2002) Arsenic, boron, nickel, silicon and vanadium. in Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, arsenic, Boron, Chromium, copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, National Academy Press, Washington DC: pp. 502-553.
- 5) 鈴木泰夫(1993) 食品の微量元素含量表, 第一出版, 東京.
- 6) 健康・栄養情報研究会編(2003) 平成12年厚生労働省国民栄養調査結果, 第一出版, 東京.
- 7) Pennington JA, Jones JW (1987) Molybdenum, nickel, cobalt, vanadium, and strontium in total diet. J Am Diet Assoc 87: 1644-1650.
- 8) Nielsen FH (1985) The importance of diet composition in ultratrace element research. J Nutr 115: 1239-1247.

## 飼料中モリブデン濃度がラット臓器および血清モリブデン濃度に及ぼす影響

吉原花織, 福永健治, 吉田宗弘

(関西大学化学生命工学部食品工学研究室\*)

### Effect of Dietary Molybdenum Level on Tissue and Serum Molybdenum Concentrations in Rats

Kaori YOSHIHARA, Kenji FUKUNAGA and Munehiro YOSHIDA

*Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering,*

*Kansai University, Yamate 3-3-35, Suita, Osaka 564-8680, Japan*

#### Summary

Molybdenum status was examined in rats fed experimental diets containing graded level of molybdenum. Male 5-week Wistar rats were divided into three groups. One group was fed a basal AIN93G diet without ammonium molybdate (molybdenum content, 0.08  $\mu\text{g/g}$ ) and other groups were fed the basal diet supplemented with 0.1 or 0.5  $\mu\text{g/g}$  of molybdenum as ammonium molybdate for 4 weeks. Molybdenum concentrations in liver and kidney of the rats were not varied with dietary molybdenum intake level but the serum molybdenum concentration was gradually increased with an increase of dietary molybdenum level. Dietary molybdenum level did not effect on copper concentrations in the liver, kidney and serum as well as xanthine oxidase activity in the liver and the serum uric acid level. These results indicate that variation of dietary molybdenum level in the present study (0.08 to 0.58  $\mu\text{g/g}$ ) did not effect on molybdenum status other than serum molybdenum concentration.

モリブデンはキサンチンオキシダーゼなどの補酵素として機能し、必須微量元素と位置づけられている<sup>1)</sup>。しかしヒトのモリブデン欠乏は、モリブデンをほとんど含まない高カロリー輸液の長期投与に伴って発生した一例のみであり<sup>2)</sup>、食事性欠乏は知られていない。これは、モリブデンが穀物や豆類に豊富に含まれるため、1日摂取量が所要量(25~30  $\mu\text{g/日}$ )<sup>3)</sup>をはるかに超える150  $\mu\text{g}$ 以上であることに起因している<sup>4)</sup>。ヒトを対象にした出納試験では、モリブデン摂取量の広範囲にわたって平衡状態が維持されることが示されている<sup>5, 6)</sup>。このことは、モリブデン摂取量が変動しても組織中モリブデン濃度に変化がなく、体内のモリブデン状態が一定に維持されることを意味する。一方、日本人の血清や母乳のモリブデン濃度は欧米人よりもやや高い<sup>7, 8)</sup>。これは日本人のモリブデン摂取が欧米人よりも多いためと思われる。しかし、ヒトや実験動物を対象にして、モリブデン摂取量と組織および血清モリブデン濃度との関係を検討した報告は少ない<sup>9-11)</sup>。本報告は、モリブデン濃度を段階的に変化させた飼料でラットを飼育し、組織および血清のモリブデン濃度を測定した結果を述べるものである。

\*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

## 実験方法

### 1. 実験動物と飼料

5週齢のWistar系雄ラット24匹を6匹ずつ3群に分け、1群にはAIN93G飼料からモリブデン酸アンモニウムを除いた低モリブデン飼料、他の2群にはこの低モリブデン飼料に0.1または0.5  $\mu\text{g/g}$ のモリブデンをモリブデン酸アンモニウムの形態で添加した飼料を投与し、4週間飼育した。なお低モリブデン飼料のモリブデン含量の実測値は0.08  $\mu\text{g/g}$ であった。

飼育期間終了後、すべてのラットをエーテル麻酔下で解剖し、肝臓、腎臓および血清を得た。

### 2. 分析

#### (1) モリブデンの定量

約0.5 gの肝臓または腎臓に5 mLの濃硝酸を加え、100°Cで不溶物がなくなるまで加熱した。分解液を蒸留水を用いて50 mLにメスアップ後、含有されるモリブデンを誘導結合プラズマ質量分析(ICPMS)により定量した<sup>4)</sup>。

血清2 mLをろ紙に入れ、80°Cで乾燥させた後、電気炉中550°Cで16時間灰化した。灰化した血清を5 mLの2%硝酸に溶解後、含有されるモリブデンをICPMSにより定量した<sup>7)</sup>。

#### (2) 銅の定量

上記の調製試料を蒸留水で8~20倍に希釈後、ICPMSを用いて銅を定量した。

#### (3) 肝臓キサンチンオキシダーゼ活性の測定

肝臓約1 gに9倍量の生理食塩水を加えてホモジナイズし、10%ホモジネートを調製した。得られたホモジネートを8,000 x gで15分間遠心した。遠心後の上清0.2 mLに、0.3 mMキサンチン溶液0.6 mL、0.136 Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.4) 2.2 mLを混合し、37°Cで10分間反応させた。反応終了後、20%過塩素酸1 mLを加えて遠心し、上清を得た。上清中に存在する尿酸を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量することにより、肝臓中のキサンチンオキシダーゼ活性を求めた。HPLCの条件は以下のとおりである。カラム、CAPCELL PAK C18 (4.6 mm  $\phi$  x 150 mm, 資生堂)；移動相、25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.0)/アセトニトリル=1/99 (v/v)；流速、1.0 mL/min；検出、UV 292 nm。

#### (4) 血清尿酸の定量

血清尿酸濃度はキット(尿酸C-テストワコー, 和光純薬)を用いて測定した。

## 結果

Table 1に肝臓、腎臓および血清のモリブデン濃度をまとめた。肝臓と腎臓のモリブデン濃度は、飼料からのモリブデン摂取量の増減の影響をまったく受けず、一定範囲に維持された。これに対して血清モリブデン濃度はモリブデン摂取量の増減に対応して変動し、基本食群に比較してモリブデン添加食投与群において有意に高い値を示した。

Table 2に臓器と血清の銅濃度、Table 3に肝臓のキサンチンオキシダーゼ活性と血清尿酸濃度をまとめた。いずれの測定項目も、飼料からのモリブデン摂取量の増減の影響をまったく受けず、各群間に有意な差は認められなかった。

**Table 1** Tissue and serum molybdenum levels in rats fed experimental diets

Level of Mo added to diet ( $\mu\text{g/g}$ )	Molybdenum level		
	Liver (ng/g)	Kidney (ng/g)	Serum (ng/mL)
0	839 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	478 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
0.1	949 $\pm$ 32 <sup>a</sup>	508 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>
0.5	893 $\pm$ 44 <sup>a</sup>	496 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	12.4 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>

Values are means  $\pm$  SEM (n = 6).

Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 2** Tissue and serum copper levels in rats fed experimental diets

Level of Mo added to diet ( $\mu\text{g/g}$ )	Copper level		
	Liver ( $\mu\text{g/g}$ )	Kidney ( $\mu\text{g/g}$ )	Serum ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	3.41 $\pm$ 0.26	7.46 $\pm$ 0.98	0.13 $\pm$ 0.03
0.1	4.00 $\pm$ 0.87	9.23 $\pm$ 0.86	0.14 $\pm$ 0.02
0.5	3.69 $\pm$ 0.18	9.45 $\pm$ 0.87	0.17 $\pm$ 0.02

Values are means  $\pm$  SEM (n = 6).

**Table 3** Liver xanthine oxidase activity and serum uric acid level in rats fed experimental diets

Level of Mo added to diet ( $\mu\text{g/g}$ )	Liver xanthine oxidase (unit/g protein)	Serum uric acid ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	0.16 $\pm$ 0.01	128 $\pm$ 1.7
0.1	0.13 $\pm$ 0.02	12.2 $\pm$ 0.8
0.5	0.12 $\pm$ 0.02	13.3 $\pm$ 0.8

Values are means  $\pm$  SEM (n = 6). A unit of xanthine oxidase activity is expressed as  $\mu\text{mol}$  uric acid formed per minute.

## 考 察

モリブデンの過剰摂取は、血清尿酸濃度の上昇や銅欠乏を招くことが知られているが<sup>12, 13)</sup>、今回の実験では、血清尿酸や組織中銅濃度の数値に各群間に差がなかった。モリブデン中毒を起こした家畜が摂取していた飼料のモリブデン濃度は20~100  $\mu\text{g/g}$ であったと報告されていることから<sup>14)</sup>、今回のモリブデン投与量の範囲は過剰域にはるかに及ばなかったといえる。今後、より高濃度のモリブデンを含有した飼料を用いて、モリブデン投与の影響を検討する必要があると思われる。

Table 1に示したように、今回のモリブデンの投与範囲においては、血清モリブデン濃度は摂取量に応じて変動したのに対して、肝臓と腎臓のモリブデン濃度は一定範囲に維持されていた。またモリブデン含有酵素であるキサンチンオキシダーゼ活性にも各群間に差はなかった。Wangらも飼料中モリブデン濃度0.1~0.8  $\mu\text{g/g}$ の範囲では、臓器中のモリブデン濃度とモリブデン酵素の活性はほぼ一定値に維持されることを観察している(ただし、この研究では飼料のモリブデン濃度は実測されていない)<sup>9)</sup>。このことから、今回のモリブデン摂取の範囲(0.08~0.58  $\mu\text{g/g}$ )であれば、血清のモリブデン濃度は変動するが組織中のモリブデン濃度は一定範囲に維持されており、モリブデンを必要とする生理機能も維持されることを意味している。

今回の実験において、低モリブデン飼料として用いたAIN93Gをベースとした低モリブデン飼料には0.08  $\mu\text{g/g}$ のモリブデンが含まれていた。これはAIN93Gを構成するミルクカゼインとコーンスターチにモリブデンが混入していたためである。ヒトの食事摂取量(乾燥重量)を約500 g/日と仮定して、飼料中濃度0.08  $\mu\text{g/g}$ をヒトの摂取量に換算すると40  $\mu\text{g}$ /日になる。日本人を対象にした食事摂取基準では、モリブデンの摂取推奨量(RDA)を20~25  $\mu\text{g}$ /日としていることから<sup>3)</sup>、今回の実験では基本食を投与したラットにおいてもモリブデンが充足していた可能性は高い。一方、モリブデン添加食のモリブデン含有量(0.18, および0.58  $\mu\text{g/g}$ )を同様にヒトの摂取量に換算すると、それぞれ90, および290  $\mu\text{g}$ /日となる。食事摂取基準におけるモリブデンの摂取上限値(UL)が230~320  $\mu\text{g}$ /日であることから<sup>3)</sup>、0.5  $\mu\text{g/g}$ のモリブデンを添加した群は食事摂取基準のUL相当量のモリブデンを摂取したとみなせる。以上のこと、および日本人のモリブデン摂取量は150~320  $\mu\text{g}$ /日の範囲にあると推定されていることをあわせると<sup>4)</sup>、今回のモリブデンの投与量はRDAをやや上回る摂取量から日本人のモリブデン摂取量の上限をカバーしているといえるだろう。

以上のことから、今回の実験結果は、モリブデン摂取が食事摂取基準のRDA~ULの範囲、あるいは現在の日本人の範囲であれば、血清のモリブデン濃度は変動するが、モリブデンの恒常性は維持されることを示すといえるだろう。



このことは、日本人を対象にした調査研究において、血清モリブデン濃度に個人差が大きいこと<sup>7)</sup>、モリブデン出納値がほぼゼロに維持されていること<sup>6)</sup>、とよく一致している。

今回の実験では低モリブデン飼料自体に相当量のモリブデンが混入していたために、モリブデン不足の状態を引き起こすことが不可能であった。今後、モリブデンの生理機能を検討し、モリブデンの必要量を推定するには、モリブデン混入の確率が低い素材によって調製された、カゼインやコーンスターチを使用しない飼料を用いることが必要といえる。

#### 参考文献

- 1) Rajagopalan KV (1987) Molybdenum-An essential trace element. *Nutr Rev* 45: 321 - 328.
- 2) Abumrad NN, Schneider AJ, Steel D, Rogers LS (1981) Amino acid intolerance during prolonged total parenteral nutrition reversed by molybdate therapy. *Am J Clin Nutr* 34: 2551 - 2559.
- 3) 厚生労働省策定 (2005) 日本人の食事摂取基準 [2005年版], 第一出版, 東京: pp. 152 - 155.
- 4) Hattori H, Ashida A, Itô C, Yoshida M (2004) Determination of molybdenum on foods and human milk, and an estimate of average molybdenum intake in the Japanese Population. *J Nutr Sci Vitaminol* 50: 404 - 409.
- 5) Turnland JR, Keyes WR, Peiffer GL (1995) Molybdenum absorption, excretion and retention studied with stable isotopes in young men at five intakes of dietary molybdenum. *Am J Clin Nutr* 62: 790 - 796.
- 6) Yoshida M, Hattori H, Ôta S, Yoshihara K, Kodama N, Yoshitake Y, Nishimuta M (2006) Molybdenum balance in healthy young Japanese women. *J Trace Elem med Biol* 20: 245 - 252.
- 7) Yoshida M, Ôta S, Fukunaga K, Nishiyama T (2006) Serum molybdenum concentration in healthy Japanese adults determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Trace Elem Med Biol* 20: 19 - 23.
- 8) 吉田宗弘, 伊藤智恵, 服部浩之, 土田 博, 米久保明得, 西牟田 守 (2004) 日本における母乳および調製粉乳中のモリブデン濃度と乳児のモリブデン摂取量. *微量栄養素研究* 21: 59 - 64.
- 9) Wang X, Oberleas D, Yang MT, Yang SP (1992) Molybdenum requirement of female rats. *J Nutr* 122: 1036 - 1041.
- 10) Pandey R, Kumar R, Singh SP, Srivastava SP (2002) Molybdenum in rat tissue. *Human Exp Toxicol* 21: 33 - 35.
- 11) Turnlund JR, Keyes WR (2004) Plasma molybdenum reflects dietary molybdenum intake. *J Nutr Biochem* 15: 90 - 95.
- 12) Walravens PA, Moure-Eraso R, Solomons CC, Chappell WR, Bentley G (1979) Biochemical abnormalities in workers exposed to molybdenum dust. *Arch Environ Health* 34: 302 - 308.
- 13) Vyskocil A, Viau C (1999) Assessment of molybdenum toxicity in humans. *J Appl Toxicol* 19: 185 - 192.
- 14) Mills CF, Davis GK (1987) Molybdenum, In: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 5th ed. (ed by Mertz W), Academic Press, New York, pp. 429 - 463.

# 微量元素(5)

## マンガン摂取 — 過不足と茶の影響 —

関西大学 化学生命工学部 食品工学研究室 吉田宗弘 *Yoshida, Munehiro*

マンガン (Mn) はピルビン酸カルボキシラーゼとスーパーオキシドジスムターゼの構成因子であり、ヒトを含む高等動物において必須の微量ミネラルと位置付けられている。Mnの1日摂取量はmgオーダーであり、銅と鉄・亜鉛の中間に位置する。しかしMnの体内存在量(約10mg)はこれらの元素よりも2桁少なく、推奨量が数10 $\mu$ g/日であるセレンやモリブデンと同程度である。これはMnの吸収率がきわめて低い(数%またはそれ以下)ためである。

本稿では、Mn摂取の過不足の可能性とMn摂取に及ぼす茶の影響を解説する。

### Mnの摂取不足は起こりうるか

ヒトでのMn欠乏の報告はきわめて少ない。実験的に調製した特殊なMn欠乏食(Mn摂取量0.11mg/日)を39日間投与された若い男性では、血清コレステロール濃度のわずかな低下と皮膚症状が観察されている<sup>1)</sup>。この皮膚症状はMn投与で消失することから、Mn欠乏の一症状とみなせる。この実験では、Mnの最小必要量を、平均的には0.74mg/日、吸収率などが低いヒトでは2.11mg/日と推定している。別の実験において、8週間にわたる0.8mg/日の低Mn摂取がいかなる健康障害も起こしていないことから<sup>2)</sup>、この推定は妥当なものと考えられる。一方、わが国の食事摂取基準におけるMn摂取の目安量は、男性4mg/日、女性3.5mg/日であり<sup>3)</sup>、上記の数値よりも相当高い。これは、わが国の目安量が日本人のMn摂取量の推定値(平均3.7mg/日)をもとに設定されているためである。

図は、日本人の食事由来のMn摂取量を食品群

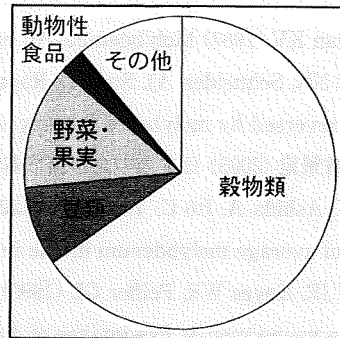


図 日本人のマンガン摂取に及ぼす各食品群の寄与 (文献4をもとに作成)

別に示したものである<sup>4)</sup>。Mn供給源の大半は穀物などの植物性食品である。Mn摂取量の計算には後述の茶由来のMn摂取量が反映されていないため、日本人の平均的なMn摂取量は5mg/日を上回っている可能性が高い。したがって、一般的な食生活においてMn摂取不足を懸念する必要はないといえる。

### Mnの過剰摂取

Mnの過剰摂取はさまざまな神経障害を引き起こすことが知られている。しかし最初に述べたように、Mnの消化管吸収率はきわめて低いため、食事由来のMnによる過剰障害はほとんど知られていない。たとえば、実験的に食事摂取基準の上限値(11mg/日)の2倍近くに相当する20mg/日のMnを8週間投与されたヒトにおいても、問題となるような障害は観察されていない<sup>2)</sup>。

近年、カルシウムなどのミネラルの消化管吸収を促進する食品素材が開発されており、いわゆる機能性食品として市販されている。このようなミネラル吸収促進成分はMnの吸収も促進する可能性があるため、実質的にMn過剰摂取を引き起

こす危険性がある。しかし鉄強化剤として用いられた EDTA 鉄は Mn の消化管吸収と尿中排泄に影響を与えていない<sup>9)</sup>。筆者らも、動物実験において、カルシウム吸収を促進するオリゴ糖の一種が Mn 吸収には影響を与えないことを確認している。

Mn 過剰摂取が生ずる危険性があるのは、高カロリー輸液が用いられる場合である。かつて、この輸液には亜鉛などの微量元素が添加されておらず、種々の微量元素欠乏が発生した。このため、現在では微量元素を添加した輸液が用いられている。Mn は必須ミネラルであるため、欠乏症発生を予防するために、一定量 (約 1 mg/日) が輸液に添加されていた。しかし、Mn を添加した輸液を用いた場合に、頭痛や脳 MRI 像の異常を認める症例が相ついでおり、輸液への Mn 添加は慎重に進める必要があるとされている<sup>6,7)</sup>。現在、輸液への Mn 添加は、低用量 (約 0.05 mg/日) で行うか、または全血 Mn 濃度が基準値 (0.5~2.5 μg/dl) を下回った場合にのみ実施されることが多い。

## Mn 摂取と茶

上述のごとく食事由来の Mn は吸収率が低い。そのため、Mn 過剰障害の原因となる可能性は低い。しかし最近、英国において茶の大量消費が Mn 過剰障害を促進する可能性が指摘されている<sup>9)</sup>。つぎに Mn 摂取に及ぼす茶の影響について述べる。

産地や製法の異なるさまざまな茶葉を収集して Mn 濃度を測定すると、20~150 mg/100 g の範囲にあり、食品成分表に記載された数値 (煎茶 55 mg/100 g, 紅茶 21 mg/100 g) にほぼ一致する<sup>9)</sup>。また実験的に調製した浸出液の Mn 濃度も食品成分表に記載された数値 (煎茶 3.1 mg/kg, 紅茶 2.2 mg/kg, ウーロン茶 2.4 mg/kg) にほぼ一致する<sup>9)</sup>。しかし、家庭で実際に調製・飲用されている茶浸出液と市販の缶およびペットボトル入り茶系飲料の Mn 濃度は 0.5~2.5 mg/l の範囲にあり、食品成分表記載のものよりも明らかに低値で

ある<sup>9,10)</sup>。したがって、食品成分表に記載されている茶浸出液の Mn 濃度の数値は、一般に飲用されているものに適用するには少し高過ぎるといえる。茶以外の植物の浸出液が混入しているハーブ茶の Mn 濃度は、茶とほかの植物の量比のばらつきを反映してさまざまな値となる。たとえば、茶をまったく使用していない麦茶の Mn 濃度はきわめて低い。

茶系飲料の 1 日消費量は 0.5~1.0 l の範囲にある人が多いので、茶からの Mn 摂取は平均的には 0.5~2 mg/日程度と思われる<sup>10)</sup>。したがって、茶由来の摂取量を加えたとしても Mn 摂取量が上限値の 11 mg/日を超える可能性は低い。しかし、茶の Mn 濃度が産地ごとに変動するため、浸出液中 Mn 濃度が 5 mg/kg に近いケースも考えられる。このような茶を大量 (2 l 以上) に飲用すれば、無視できない量の Mn 摂取を引き起こすことになる。最近では茶の健康効果が強調される傾向にあるが、茶の大量消費はフッ素の過剰障害を起こすことが報告されている<sup>11)</sup>。茶を大量に飲用する人については、Mn に関しても注意を払う必要があるだろう。

## 文 献

- 1) Friedman BJ, Freeland-Graves JN, Bales CW, et al. *J Nutr* 1987; 117: 133-43.
- 2) Finley JW, Penland JG, Pettit RE, Davis CD. *J Nutr* 2003; 133: 2849-56.
- 3) 厚生労働省策定。日本人の食事摂取基準 [2005 年版]: 第一出版; 2005. p 156-60.
- 4) 鈴木泰夫。ミネラル・微量元素の栄養学 (鈴木継美, 和田 攻編): 第一出版; 1994. p 469-81.
- 5) Davidsson L, Almgren A, Hurrell RF. *J Nutr* 1998; 128: 1139-43.
- 6) Nagamoto S, Umehara F, Hanada K, et al. *J Neurol* 1999; 162: 102-5.
- 7) Masumoto K, Suita S, Taguchi T, et al. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001; 25: 95-9.
- 8) Ross C, O'Reilly DS, McKee R. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 226-8.
- 9) 林希未子, 大西美加, 堀越亮介, ほか。微量栄養素研究 2004; 21: 115-20.
- 10) 林希未子, 福永健治, 吉田宗弘。日本健康医学会雑誌 2005; 14: 19-23.
- 11) Cao J, Bai X, Zhao Y, et al. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 1340-3.

## 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 μg/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 μg/日程度であるため、400 μg/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 μg/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

\* 連絡先

滋賀県立大学人間文化学部生活文化学科食生活専攻: 〒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>6)</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>11)</sup>、N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)<sup>11)</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>13)</sup>、パントテン酸<sup>14)</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、腎機能障害をとも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、ビ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>18</sup>、個体差の安全係数を10<sup>18</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

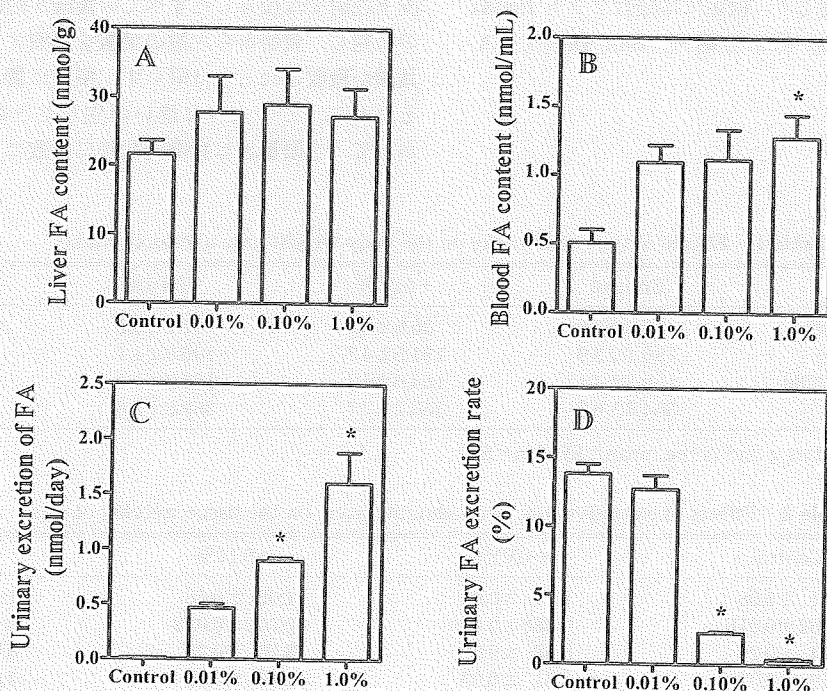


Fig. 1. Effects of excess folic acid on the contents of folic acid in liver (A), blood (B) and urine (C), and the urinary folic acid excretion rate (D)

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.

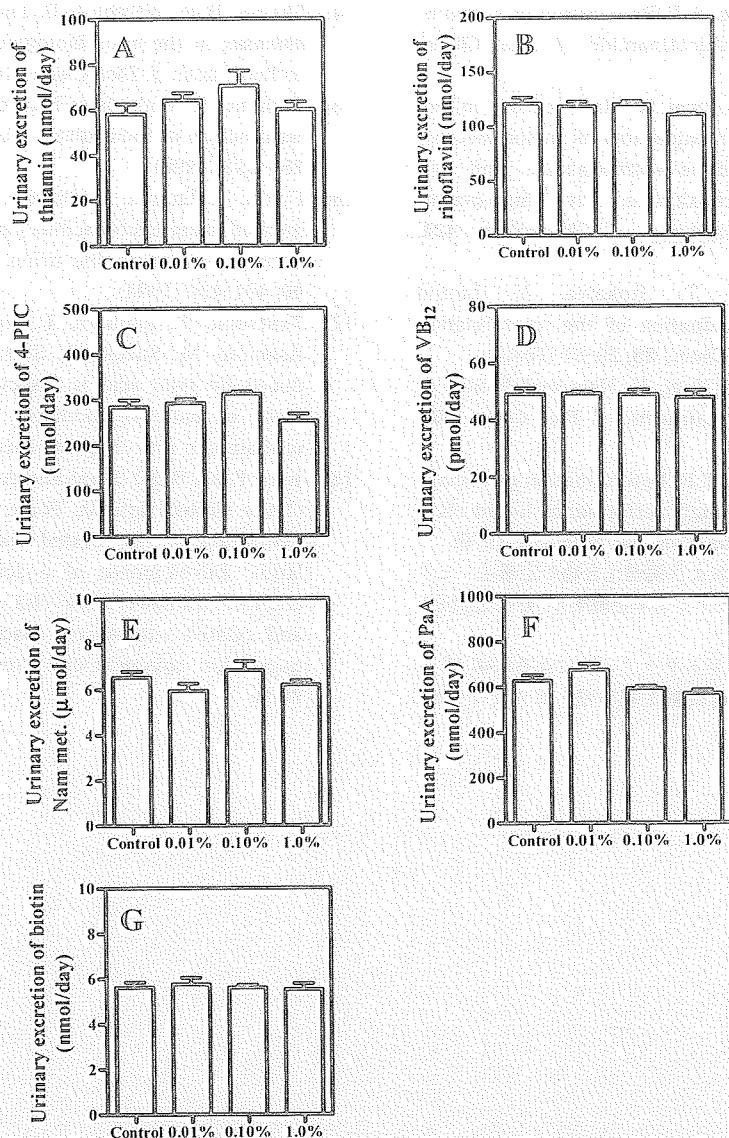


Fig. 2. Effects of excess folic acid administration on the urinary excretions of thiamin (A), riboflavin (B), 4-PIC (C), cyanocobalamin (D), nicotinamide metabolites (E), pantothenic acid (F), and biotin (G). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ ).

量を策定する際の参考データの1つになるものと考え。

#### 謝 辞

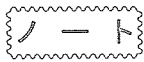
本研究は、平成16年度～18年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究」（主任研究者、柴田克己）の成果の一部である。関係各位に謝意を表す。

#### 文 献

- Emery, A. E. Foliates and fetal central-nervous-system malformations. *Lancet*, 309, 703 (1977).
- 「神経管閉鎖障害の発症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、一部のピリドキシン<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 μmol)
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.92	0.82	0.87 (2.31 μmol)
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	1.24	0.86	1.05 (6.21 μmol)
Vitamin B <sub>12</sub> (μg 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 μmol)
Pantothenic acid (mg)	9.3	9.3	9.3 (42.5 μmol)
Folates (μg as pteroyl monoglutamic acid)	230	282	256 (580 nmol)
Biotin (μg)	67	53	60 (246 nmol)
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	118	112	115 (65.3 μmol)

\*<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±0.0歳(平均±SD)、身長は161.7±1.7cm、体重は51.2±2.8kg、BMIは19.6±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

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

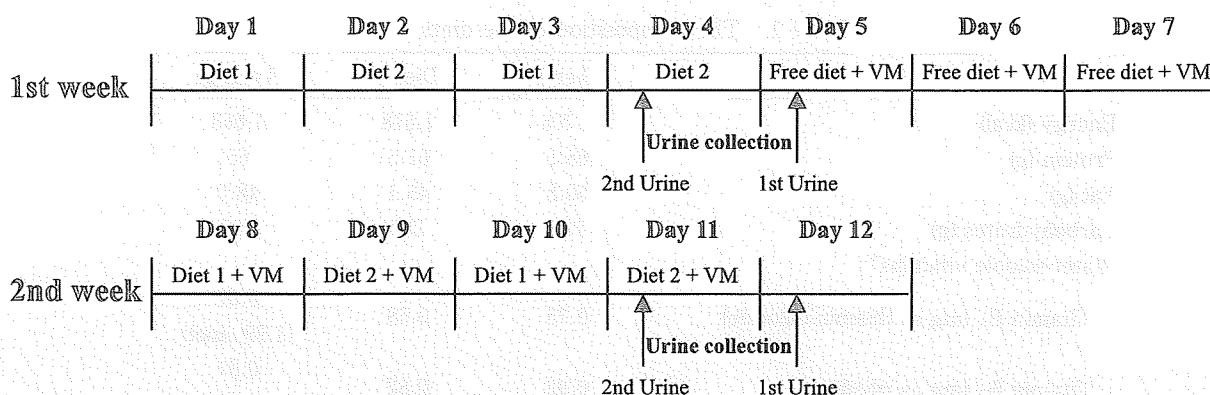


Fig. 1. Experimental design

し 80 g, ピーマン 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>13)</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。

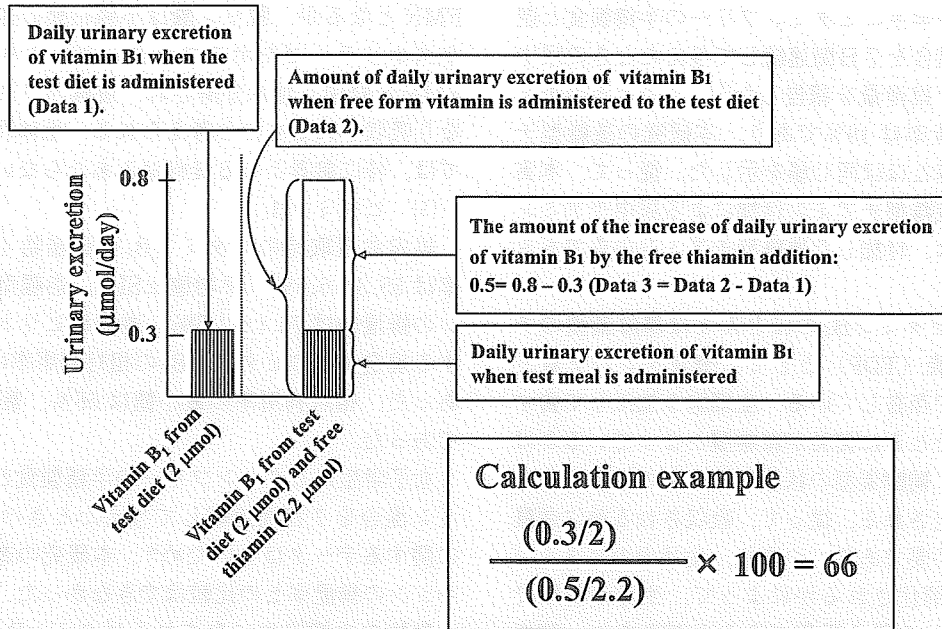


Fig. 2. Calculation example of proposed relative availability determination

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.