

取量を日本人の食事摂取基準（2010年版）¹⁾に記載された推定平均必要量（EAR）あるいは目安量（AI）と比較した（図1）。ビタミンB₁およびビタミンB₆については全ての時期で、葉酸については妊娠期で、ビタミンCについては授乳期で、平均摂取量はEARより低値を示した。妊娠期におけるビタミンB₁、ビタミンB₆、葉酸の平均摂取量は、それぞれEARの70～80%、約60%、約70%であった。ビタミンB₁₂およびナイアシンについては、全ての時期において平均摂取量はEARよりも高値を示した。ビタミンB₂の平均摂取量はいずれの時期においてもEARとほぼ同値を示した。パントテン酸の平均摂取量はいずれの時期においてもAIとほぼ同値を示した。

3. 尿中水溶性ビタミン排泄量

ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビタミンB₆、ビタミンB₁₂、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビオチン、ビタミンCの尿中排泄量を図2に示した。ビタミンB₁₂を除く8種類の水溶性ビタミンについて、平均尿中排泄量を目標排泄量の下限值と比較した。ビタミンB₁₂に目標排泄量がないのは、尿中排泄量は尿量に依存し、摂取量および栄養状態を反映しないためである²¹⁾。ビタミンB₂、ビタミンB₆、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビオチンについては、いずれの時期においても平均尿中排泄量は目標排泄量の下限より高い値を示した。ビタミンB₁については妊娠末期、ビタミンCについては妊娠初期および中期において、平均尿中排泄量は目標排泄量の下限值より低い値を示した。

D. 考察

本研究では、のべ169名の妊婦および授乳婦を対象として、DHQを用いた食事調査と

24時間蓄尿を行い、水溶性ビタミンの摂取量と尿中排泄量を求めた。妊婦は妊娠時期に応じて初期、中期、末期に、授乳婦も同様に前期と後期に分類した。各時期における平均摂取量を日本人の食事摂取基準（2010年版）に記載されたEARあるいはAIと比較した。また、各時期における尿中排泄量は目標排泄量の下限值と比較した。

平均摂取量がEARより低値を示した水溶性ビタミンはビタミンB₁、ビタミンB₆、葉酸であった。ビタミンB₁、ビタミンB₆、葉酸の妊娠期の平均摂取量はそれぞれEARの70～80%、約60%、約70%であった。ビタミンB₁の平均尿中排泄量は、妊娠中期では目標排泄量の下限とほぼ一致し、妊娠末期では目標排泄量の約80%と摂取量を反映した値となった。一方、ビタミンB₆と葉酸については、尿中排泄量はいずれも目標排泄量の下限よりも高値を示した。すなわち、妊娠期のビタミンB₆と葉酸の平均摂取量はEARより低値であるが、尿中排泄量に基づいて判定するとビタミンB₆と葉酸の栄養状態は良好であることが示された。

日本人の食事摂取基準（2010年版）¹⁾において、妊婦におけるビタミンB₆の付加量は米国のDietary Reference Intakes²²⁾にしたがって策定している。これは、妊娠による血漿PLP濃度の低下を防ぐ必要があり、ビタミンB₆の胎盤への蓄積率、食事性ビタミンB₆の生物有効性、体重増加と代謝変化の時期などを考慮して血漿PLP濃度の維持に必要なビタミンB₆摂取量を算出したものである。非妊娠女性におけるビタミンB₆のEARが1.0 mg/日であるのに対し、妊婦の付加量のEARが0.7 mg/日と高値であるのは、調査結果や介入試験によって得たデータに基づいた値ではなく、仮

定に基づいて様々な要因を加算して算出したためだと考えられる。妊婦におけるビタミン B₆ の平均摂取量は非妊娠女性の EAR および推奨量 (RDA) と同程度であり、この摂取量で尿中排泄量を指標とした栄養状態が良好であったことから、妊婦におけるビタミン B₆ の付加量が高い可能性が示された。

日本人の食事摂取基準 (2010 年版)¹⁾において、妊婦における葉酸の付加量は、妊婦の赤血球葉酸レベルを適正量に維持できたプテロイルモノグルタミン酸補足量に基づいて策定された。このデータを求めた研究では、妊婦に 100 µg/日のプテロイルモノグルタミン酸を補足することにより、赤血球の葉酸濃度の低下を防ぐことに成功している^{23, 24)}。しかし、100 µg/日未満のプテロイルモノグルタミン酸については検討していない。非妊娠女性における葉酸の EAR が 200 µg/日 (プテロイルモノグルタミン酸は食事性葉酸の 2 倍のビタミン活性を有するため) であるのに対し、妊婦の付加量の EAR が 200 µg/日と高値であるのはこの理由によるものである。妊婦における葉酸の平均摂取量は非妊娠女性の RDA より多く、この摂取量で尿中排泄量を指標とした栄養状態が良好であったことから、妊婦における葉酸の付加量が高い可能性が示された。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用案登録

なし

3. その他

なし

I. 引用文献

1. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準 (2010 年版), (2009).
2. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimura 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* (2005) **51**, 319-328.
3. Fukuwatari T, and Shibata K. Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* (2008) **54**, 223-229.
4. Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, and Shibata K. Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamin levels correlate with their intakes in free-living Japanese university students. *Eur J Clin Nutr* (2010) **64**, 800-807.

5. Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, and Shibata K. Urinary excretion of vitamin B₁, B₂, B₆, niacin, pantothenic acid, folate, and vitamin C correlates with dietary intakes of free-living elderly, female Japanese. *Nutr Res* (2010) **30**, 171-178.
6. Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, and Shibata K. Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamin levels correlate with their intakes in free-living Japanese school children. *Public Health Nutr* (2011) **14**, 327-333.
7. 柴田克己. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金, 循環器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構築に関する研究, 平成 19 年度総括・分担研究報告書. (2008).
8. Sasaki S, Yanagibori R, and Amano K. Validity of a self-administered diet history questionnaire for assessment of sodium and potassium: comparison with single 24-hour urinary excretion. *Jpn Circ J* (1998) **62**, 431-435.
9. Sasaki S, Yanagibori R, and Amano K. Self-administered diet history questionnaire developed for health education: a relative validation of the test-version by comparison with 3-day diet record in women. *J Epidemiol* (1998) **8**, 203-215.
10. Sasaki S, Ushio F, Amano K, Morihara M, Todoriki O, Uehara Y, and Toyooka E. Serum biomarker-based validation of a self-administered diet history questionnaire for Japanese subjects. *J Nutr Sci Vitaminol* (2000) **46**, 285-296.
11. 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—五訂増補 日本標準食品成分表—大蔵印刷局, 東京, 2005.
12. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己. 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファン—ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位, *食品衛生学雑誌* (2004) **45**, 231-238.
13. Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) **258**, 5623-5628.
14. Gregory JF 3rd, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) **32**, 879-883.
15. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, and Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* (1998) **46**, 5177-5180.
16. Shibata K, Kawada T, and Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5- carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4- carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) **424**, 23-28.
17. 柴田克己. 高速液体クロマトグラフィーによる尿中 N¹-メチルニコチンアミドの超微量定量方法. *ビタミン* (1987) **61**, 599-604.
18. Skeggs HR, and Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of

- pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) **156**, 21-26.
19. Aiso K, and Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for alpha-amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) **44**, 361-370.
 20. Kishida K, Nishimoto Y, and Kojo S. Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* (1992) **64**, 1505-1507.
 21. Fukuwatari T, Sugimoto E, Tsuji T, Hirose J, Fukui T, and Shibata K. Urinary excretion of vitamin B₁₂ depends on urine volume in female university students and elderly subjects in Japan. *Nutr Res* (2009) **29**, 839-845.
 22. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press, 1998.
 23. Chanarin I, Rothman D, Ward A, and Perry J. Folate status and requirement in pregnancy. *Br Med J* (1968) **2**, 390-394.
 24. Daly S, Mills JL, Molloy AM, Conley M, Lee YJ, Kirke PN, Weir DG, and Scott JM. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet* (1997) **350**, 1666-1669.

表 1. 対象者の特徴

	妊娠初期 (16 週未満)	妊娠中期 (16~28 週未満)	妊娠末期 (28 週以降)	授乳前期 (0~5 か月)	授乳後期 (6~11 か月)
対象者数	5	25	34	55	50
身体的特徴					
年齢 (歳)	30.4 ± 4.0	31.2 ± 3.4	31.7 ± 3.8	32.1 ± 3.6	31.6 ± 2.9
身長 (cm)	161.1 ± 5.6	158.9 ± 4.6	159.6 ± 4.6	160.0 ± 4.5	159.2 ± 4.8
体重 (kg)	53.7 ± 3.6	53.6 ± 4.3	59.0 ± 7.5	53.6 ± 6.6	50.4 ± 6.0
BMI (kg/m ²)	20.7 ± 1.1	21.3 ± 1.8	23.1 ± 2.3	20.9 ± 2.2	19.8 ± 1.9
栄養素等摂取量					
総エネルギー (kcal/日)	1502 ± 67	1874 ± 444	1853 ± 606	2017 ± 558	1907 ± 374
たんぱく質 (%エネルギー)	13.0 ± 1.0	13.1 ± 1.9	13.7 ± 1.6	13.5 ± 1.2	13.5 ± 1.3
脂質 (%エネルギー)	27.9 ± 2.7	29.1 ± 6.3	28.7 ± 4.0	28.3 ± 4.2	27.2 ± 4.2
炭水化物 (%エネルギー)	59.1 ± 3.3	57.8 ± 6.5	57.6 ± 4.7	58.2 ± 4.6	59.6 ± 5.4

値は平均 ± 標準偏差で示した。

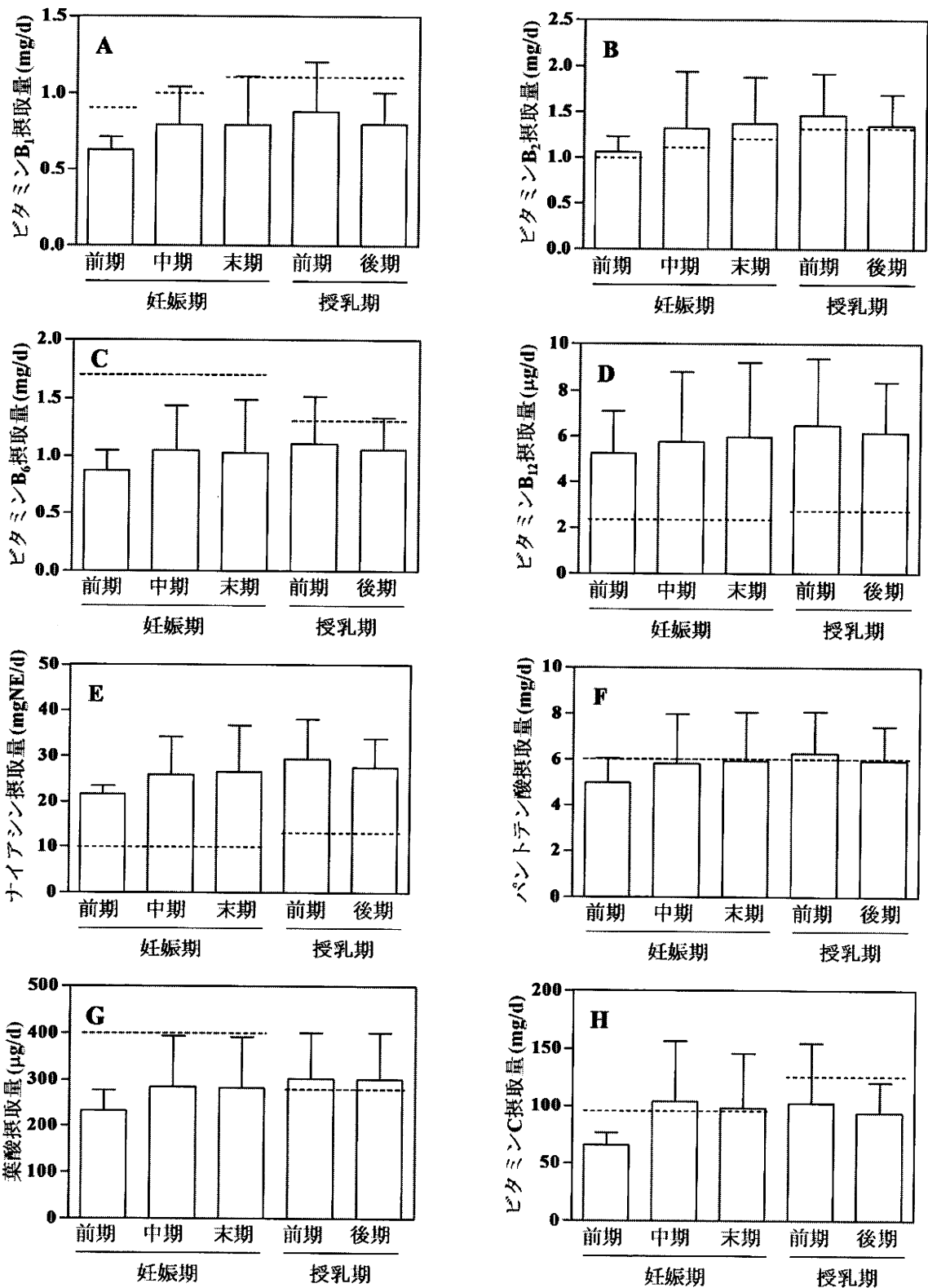


図1. 妊娠期および授乳期におけるビタミンB₁ (A), ビタミンB₂ (B), ビタミンB₆ (C), ビタミンB₁₂ (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビタミンC (H) の平均摂取量と日本人の食事摂取基準 (2010年版) に記載された推定平均必要量 (EAR) または目安量 (AI) との比較. 値は平均 ± 標準偏差で示した. 図中の破線はパントテン酸ではAIを, その他のビタミンではEARを示す.

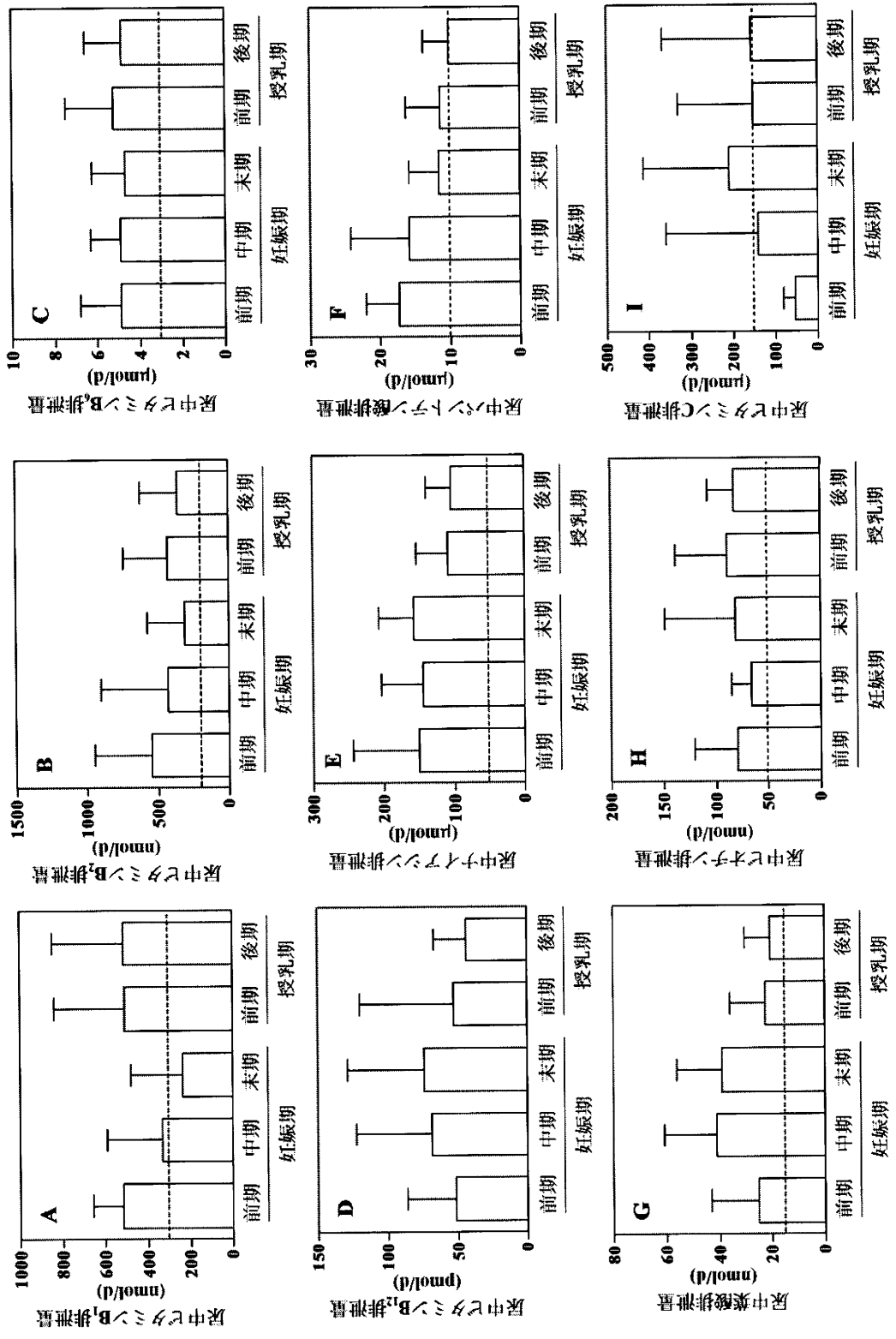


図 2. 妊娠期および授乳期におけるビタミンB₁ (A), ビタミンB₂ (B), ビタミンB₆ (C), ビタミンB₁₂ (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ピオチン (H), ビタミンC (I) の尿中排泄量. 値は平均 ± 標準偏差で示した. 図中の破線は目標排泄量を示す.

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)

日本人の食事摂取基準の改定と活用に資する総合的研究

主任研究者 徳留 信寛 国立健康・栄養研究所 理事長

II. 研究分担者の報告書

6. ビタミン不含食投与後の血中、肝臓中および尿中の水溶性ビタミン量の変動

研究分担者	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	准教授

研究要旨

我々は水溶性ビタミン摂取量と 24 時間尿中排泄量、血中濃度の関係を調べ、血中濃度は体内貯蔵を反映し、尿中排泄量は摂取量および栄養状態を評価するバイオマーカーになることを明らかにしてきた。本研究では、ビタミン摂取量の急激な減少が体内の水溶性ビタミンの動態におよぼす影響を明らかにすることを目的として、ビタミン不含食を投与したラットにおける血中、肝臓中および尿中ビタミン量の変動について検討した。6 週齢の Wistar 系雄ラット 37 匹に対照食として AIN93 ビタミン混合 1%添加食を与え、1 週間予備飼育をした。その後、31 匹は予備飼育最終日とビタミン不含食を与えた 5 日間、毎日 5 匹ずつ屠殺し、血中、肝臓中および尿中の全水溶性ビタミン量を測定し、変動を調べた。6 匹には対照食を 5 日間与え、5 日目に一緒に屠殺し、測定を行った。尿中ビタミン排泄量はビタミン B₁₂ を除き、5 日間以内に約 90%減少した。血漿ビタミン B₁ およびピリドキサルリン酸濃度は 5 日間で 10%まで低下し、血漿ビタミン B₂、ビタミン B₁₂、葉酸、パントテン酸、ビオチン濃度は 5 日間で 50~70%まで低下した。肝臓中ビタミン量はすべてのビタミンで大きな変動が見られなかった。以上のことから、ビタミン B₁₂ 以外の水溶性ビタミンにおいて、尿中排泄量は最近の低摂取量を鋭敏に反映することが明らかになった。また、ビタミン摂取量が急激に減少すると、血漿ビタミン濃度が低下し、尿中に排泄されるビタミン量が減少する、すなわち体内貯蔵量の減少を抑制しようとするメカニズムが示唆された。

A. 目的

個人のビタミン栄養状態を評価する方法として食事調査があげられるが、食事調査ではビタミンなどの微量栄養素は概数的な数値しか得ることができず、さらに生体側の情報を得ることができない。生体側の情報として血液や尿を調べることで、ビタミン栄養状態がより客観的に評価できると考えられる。当研究室では尿中ビタミン排泄量を、健康を維持するための栄養指標として利用する研究を行っており¹⁻⁶⁾、ビタミン栄養状態をより正確に評価するためには、尿中ビタミン排泄量がどのような要因によって変化するのかという情報が必要である。

当研究室では、「絶食」という要因が水溶性ビタミンの尿中排泄量にどのような影響を与えるか、ラットを用いて実験を行った⁷⁾。その結果、ビタミンB₆、葉酸、ビオチンは一過性に増加し、飢餓が2、3日続くと次第に低下した。ビタミンB₁は急激に尿中排泄量が低下し、ビタミンB₂、ビタミンB₁₂の値は徐々に低下した。

本実験では「ビタミン摂取量の急激な減少」という要因が、血中および尿中ビタミン量に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、ラットにビタミン欠乏食を与え、その変動を調べた。

B. 方法

本研究は、滋賀県動物実験委員会の承認を得て行った。

1. 実験動物

5週齢 Wistar 系雄ラット 37 匹 (109.0~118.6g) を日本クレア株式会社より購入した。

2. 飼育方法

飼育室は温度 22°C 前後、湿度 50% 前後に維

持し、12 時間の明暗サイクル (午前 6 時~午後 6 時を明) で管理した。1 匹ずつラット用代謝ケージに入れ、世話は午前 9 時~11 時の間に行った。飼料および水は自由摂取させた。

3. 実験手順

5 週齢のラットに 6 日間固形食を給餌し、さらに通常精製飼料を 1 週間給餌して予備飼育をした。実験開始時点を 0 とし、その日を Day 1 とした。その後、対照群 (n = 6) とビタミン不含食群 (V0% 群、n = 31) に群わけをした。対照群には引き続き通常精製飼料 (表 1) を、V0% 群にはビタミン不含精製飼料 (表 1) を給餌した。

飼育期間中は毎日、体重と飼料摂取量を測定し、実験期間中は毎日 24 時間尿 (午前 9 時~翌日の午前 9 時) を集めた。また、実験期間中、ビタミン不含食群のラットを毎日 5 匹ずつ午前 9 時~10 時に断頭賭殺した。実験最終日の午前 9 時~10 時には、対照群 6 匹も断頭賭殺した。屠殺したラットは、肝臓を摘出し重量を測定した。また EDTA-2K を含む試験管に血液を採取し、遠心分離 (7,000×g、30 分、室温) を行い、血漿を得た。

4. 測定項目

血中水溶性ビタミン濃度の測定を行った。(ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、遊パントテン酸、ビオチン、葉酸) (表 2)。ナイアシンは試料中に含まれているカゼインタンパク質中のトリプトファンから十分量が生合成されるため除外した。

肝臓中水溶性ビタミン含量 (ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、遊パントテン酸、ビオチン、葉酸) (表 3)。

尿中の水溶性ビタミン排泄量の測定を行った。(ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン

B₆、ビタミン B₁₂、遊パントテン酸、ビオチン、葉酸) (表 4)。

5. 統計処理

数値は全て平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した。値の比較には一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った。p 値が 0.05 以下のとき、統計的有意差があるものとした。計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism5 を用いた。

C. D. 結果および考察

1. ビタミン欠乏食投与中の体重増加量、飼料摂取量、肝臓重量の変動

飼育期間中の体重増加量、飼料摂取量、および肝臓重量を図 1 に示した。

対照群とビタミン不含食群では、体重には有意差がないが、実験開始 2 日後から飼料摂取量および体重増加量に差が始まった。ビタミン不含食を与えたことで、食事摂取量が低下したことが原因であり、実験最終日の 5 日間後の飼料摂取量は対照群で平均 20.6 g/日、ビタミン不含食群で平均 15.6 g/日であった。

肝臓重量は Control 群で平均 11.9 g、V0%群で平均 11.4 g であり有意差は見られなかった。

絶食ラットでは体重減少、および肝臓重量の減少が大きく見られたが、今回はほぼ維持された。しかし、飼料摂取量は徐々に低下していたことから、5 日間よりも長期間、ビタミン不含食で飼育する場合は Pair-fed 群を設ける必要がある。

2. 血漿中ビタミン濃度の変動

血漿ビタミン B₁、ビタミン B₆ (PLP を測定した) は、ビタミン不含食投与 5 日間で約 10% にまで低下した (図 2)。血漿ビタミン B₂、パントテン酸、葉酸、ビオチン濃度は約 50%

にまで、血漿ビタミン B₁₂ 濃度は 70% にまで低下した。

絶食ラットにおいては、他のビタミンに比べ、PLP 濃度が最も鋭敏に低下していた。血漿中のビタミン B₆ 含量を微生物定量法で遊離のビタミン B₆ を測定したが、検出されず、血漿中の主なビタミン B₆ の形態は PLP であると考えられた。現時点では、血漿 PLP 濃度はビタミン B₆ 摂取量を鋭敏に反映すると考えられるが、今後も検討が必要である。

3. 肝臓中ビタミン含量の変動

ビタミン不含食投与 5 日間で、肝臓中ビタミン B₁ 含量は 80% にまで、ビタミン B₂ 含量は 90% にまで低下した (図 3)。最も低下したビタミンは葉酸であり、ビタミン不含食投与 5 日間で約 50% にまで低下した。ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、パントテン酸、ビオチン含量はほぼ維持されていた。

絶食ラットでは肝臓の減少が顕著であったため、純粹に肝臓中ビタミン含量の変化をみることができなかったが、本実験では肝臓重量は維持され、肝臓中含量の推移をみることができた。

血中濃度を維持するため、肝臓中のビタミンはどんどん血漿中に放出されると考えていたが、5 日間という短い期間のビタミン不含食投与ではほとんど減少はみられなかった。血漿中に放出される量が減少した可能性が考えられた。

4. 尿中ビタミン排泄量の変動

ビタミン B₁ および葉酸ビタミン不含食投与 1 日間で約 10% にまで急激に低下した (図 4)。ビタミン B₂、ビタミン B₆、パントテン酸、ビオチンはビタミン不含食投与 2、3 日間で約 10% にまで低下した。ビタミン B₁₂ の変動はわずかであった。

ビタミン B₁₂ 以外の水溶性ビタミンにおいて、尿中ビタミン排泄量は鋭敏に最近の摂取量を反映することを報告してきたが¹⁻⁶⁾、本研究はこのことをより強固にする結果である。

しかし、ビタミン B₆ 以外は異化代謝産物を測定していないことが問題となってくる。たとえば、ビタミン B₁ では、チアゾールやピリミジンなどに分解され、尿中に排泄される⁸⁾。過剰分のビタミン B₁ だけでなく、代謝産物を測定すると、再利用が亢進されているのか、などといった情報を得ることができるのではないかと考えられる。

5. ビタミン不含食投与による血漿、肝臓、尿中ビタミン量の相対的変動の比較

実験開始直前の 1 日間の各々の平均値を 1 として、血漿、肝臓、尿中の各値を相対値で示した (図 5)。

ビタミンの貯蔵部位である肝臓、および全血中のビタミン量がほぼ維持されていたことから、ビタミン摂取量が急激に減少しても急激なビタミン栄養状態の悪化は見られなかった。

しかし、血漿中および尿中ビタミン量は急激に低下していることから、血漿ビタミン濃度と尿中排泄量を調節して、体内貯蔵量の減少を抑制していると示唆された。

このメカニズムとして、①肝臓からの放出が抑制された、②腎臓での再吸収が促進した、③末梢組織での再利用が亢進し、放出が抑制された、などの理由が考えられる。今後はこのメカニズムについて検討していく必要がある。

また今回はビタミンの急激な減少による変動を調べるため、ラットにビタミン不含食という極端な飼料を投与したが、ヒトにおいてビタミンをまったく摂らない食事をするこ

とはめつたにない。ヒトに応用するためには、どの程度のビタミン摂取量の変化で血漿中、および尿中排泄量は反応するのか、といった感度を調べた情報も必要である。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用案登録

なし

3. その他

なし

I. 引用文献

1. Fukuwatari T, and Shibata K. Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* (2008) **54**, 223-229.
2. Shibata K, Fukuwatari T, Watanabe T, Nishimuta and M. Intra- and inter-individual variations of blood and urinary water-soluble vitamins in Japanese Young adults consuming a semi-purified diet for 7

- days. *J Nutr Sci Vitaminol* (2009) **55**, 459-470.
3. Fukuwatari T, Sugimoto E, Tsuji T, Hirose J, Fukui T, and Shibata K. Urinary excretion of vitamin B₁₂ depends on urine volume in female university students and elderly subjects in Japan. *Nutr Res* (2009) **29**, 839-845.
 4. Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, and Shibata K. Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamins correlate to vitamin intakes in free-living Japanese university students. *Eur J Clin Nutr* (2010) **64**, 800-807.
 5. Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, and Shibata K. Urinary excretion of vitamin B₁, B₂, B₆, niacin, pantothenic acid, folate, and vitamin C correlates with dietary intakes of free-living elderly, female Japanese. *Nutr Res* (2010) **30**, 171-178.
 6. Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, and Shibata K. Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamin levels correlate with their intakes in free-living Japanese school children. *Pub Health Nutr* (2011) **14**, 327-333.
 7. Fukuwatari T, Yoshida E, Takahashi K, and Shibata K. Effect of fasting on the urinary excretion of water-soluble vitamins in humans and rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (2010) **56**, 19-26.
 8. Matsuo T, and Suzuoki Z. The occurrence of 4-methylthiazole-5-acetic acid as a thiamine metabolite in rabbit, dog, man and rat. *J Biochem* (1969) **65**, 953-960.

表 1. 飼料組成

	対照群 (通常精製食)		試験群 (ビタミン不含食)	
	%		%	
ビタミン不含ミルクカゼイン	20		20	
L-メチオニン	0.2		0.2	
α-コーンスターチ	46.9		47.5	
シヨ糖	23.4		23.8	
コーン油	5		5	
ミネラル混合 (AIN-93G-MIX) *1	3.5		3.5	
ビタミン混合 (AIN-93-nicotinic acid free) *1	1.0		0	

*1 Reeves PG. 1997. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr 127: 838S-841S.

表2. 血液中の水溶性ビタミンの調製方法と測定方法の概略

調製方法	
ビタミンB ₁	冷却した5%トリクロロ酢酸200 µLを含むマイクロチューブに血漿100 µLを加え、よく混合。水中に5分以上放置したのち、4℃、10,000 g、5分間、遠心分離。上清をマイクロフィルター(0.45 µm)でろ過。ろ液100 µLをHPLCに注入。チアミンとチアミンジリン酸(TDP)が測定できるが、値はチアミンのモル数として示した。Fukuwatari T, Suzuura C, Sasaki R, Shibata K. 2004. Action site of bisphenol A as metabolic disruptor lies in the tryptophan-nicotinamide conversion pathway. <i>Shokuhin Eiseigaku Zasshi</i> (Japanese) 45 : 231-238.
ビタミンB ₂	血漿中のビタミンB ₂ は、リボフラビン、FMN、FADの三型で存在している。その三型を温熱抽出し、アルカリ性下で光をあて、ルミフラビンに分解し* ¹ 、ルミフラビンの蛍光を蛍光検出器付きHPLCで総リボフラビン量として測定し、リボフラビンのモル数で示した。Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K (1982) A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. <i>Biochem Int</i> 4 :187-194.
ビタミンB ₆	血漿中のPLPを測定した。血清あるいは血漿0.1 mLに5%メタリン酸を0.1 mL添加し抽出した* ² 。Rybak ME, Pfeiffer CM. 2004. Clinical analysis of vitamin B ₆ determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. <i>Anal Biochem</i> 333 : 336-344.
ビタミンB ₁₂	血漿中のビタミンB ₁₂ をシアノコバラミンに変換処理した溶液を試料とした。ピタミンB ₁₂ は、シアノコバラミンを標準物質として、 <i>Lactobacillus leichmanii</i> ATCC7830を検定菌として測定した。値はシアノコバラミンのモル数として示した。Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y (1998) Biological activity of hydroxo-vitamin B ₁₂ degradation product formed during microwave heating. <i>J Agric Food Chem</i> 46 :5177-5180.
パントテン酸	血漿をそのまま試料溶液とした。パントテン酸は、D(+)-パントテン酸カルシウムを標準物質として、 <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014を検定菌として測定した。値はパントテン酸のモル数として示した。Skeggs HR, Wright LD. 1944. The use of <i>Lactobacillus arabinosus</i> in the microbiological determination of pantothenic acid. <i>J Biol Chem</i> 156 : 21-26.
葉酸	血漿をそのまま試料溶液とした。葉酸はプテロイルモノグルタミン酸を標準物質として使用し、 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469由来の <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 27773 (クロラムフェニコール耐性)を検定菌として測定した。値は、プテロイルモノグルタミン酸のモル数として示した。Aiso K, Tamura T. 1998. Trienzyme treatment for food folate analysis : Optimal pH and incubation time for α-amylase and protease treatments. <i>J Nutr Sci Vitaminol</i> 44 : 361-370.
ビオチン	血漿50 µLに2.25 mol/LのH ₂ SO ₄ を450 µL加え、オートクレーブした(121℃、1時間)。冷却後、9000×g、4℃、10 minの条件で遠心分離を行い、その上清を試料とした。ビオチンは、(+)-ビオチンを標準物質として使用し、 <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014を検定菌として測定した。値はビオチンのモル数として示した。Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. 1994. Agar plate method using <i>Lactobacillus plantarum</i> for biotin determination in serum and urine. <i>J Nutr Sci Vitaminol</i> 40 : 491-498.

*¹ ビタミンB₂

全血 100 µL

↓ ← エッペンドルフ型マイクロチューブ (1.5 mL用) 使用

↓ ← Ultra-pure water 440 µL

↓ ← 0.5 ml/L H₂SO₄ 260 µL

80 °C、15 min (蓋が開かないようにキャップをする)

↓

流水で冷却

↓

← 10% TCA 200 μ L

↓

遠心分離 (7800 \times g, 3 min)

↓

上 清 200 μ L ネジロガラス試験管使用

↓

← 1 mol/L NaOH 200 μ L

↓

光照射 (10 W 蛍光灯、光分解装置、30 min, 4°C*1)

↓

← 酢酸 20 μ L (ドラフト内)

↓

フィルター濾過 (ポアサイズ 0.45 μ m)

↓

HPLC 注入用試料 100 μ L 注入する

※ 光照射をすることで、試料中の riboflavin、FMN、FAD を lumiflavin に分解し、総ビタミン B₂ とするものであるが、riboflavin、FMN、FAD は 100% lumiflavin に転換されるわけではない。そこで転換率を求めするために、既知濃度の riboflavin 標準液 100 μ L を試料として、上記の操作を同時に行った。その際全量を合わせるために、加える Ultra-pure water を 440 μ L とする。

※ riboflavin は光に弱いため、実験操作は全てできる限り遮光しながら行う。

*1 蛍光灯の熱によって試料液が蒸発することを防ぐため、低温室 (温度設定 4°C) で光照射を行う。

光分解装置

乾固チューブ底の液面から 20 cm 離れた高さから、蛍光灯の光が当たるように木の箱 (縦 35 cm \times 横 25 cm \times 高さ 28 cm) を作り、内面をすべてアルミ製のシールで覆い、内部で蛍光灯の光を反射させる。

***²PLP (ピリドキサーールリン酸)**

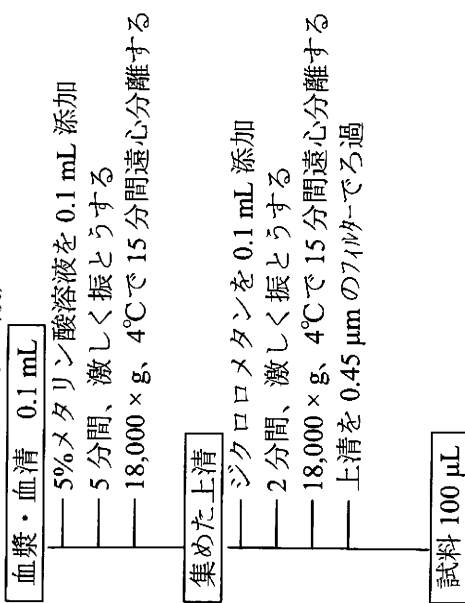


表 3. 肝臓中の水溶性ビタミンの調製方法と測定方法の概略

ビタミン名	調製方法
ビタミンB ₁	肝臓中のビタミンB ₁ はチアミンとTDPとして存在している。新鮮な肝臓組織0.5gに冷却した5%トリクロ酢酸500μLを加え、ホモゲナイズした。ホモジネートを氷中に5分以上放置したのち、4°C、10,000×g、5分間、遠心分離。上清をミクロフイルター(0.45μm)でろ過。ろ液20μLをHPLCに注入。チアミンとチアミンジリン酸(TDP)が測定できるが、値はチアミンのモル数として示した。Fukuwatari T, Suzuura C, Sasaki R, Shibata K. 2004. Action site of bisphenol A as metabolic disruptor lies in the tryptophan-nicotinamide conversion pathway. <i>Shokuhin Eiseigaku Zasshi</i> (Japanese) 45 : 231-238.
ビタミンB ₂	肝臓中のビタミンB ₂ は、リボフラビン、FMN、FADの三型で存在している。新鮮な肝臓組織0.5gに冷却した水500μLを加え、ホモゲナイズした。そのホモジネート100μLを使用して、表1に示した血液と同じ操作を行った。概略は、その三型を温熱抽出し、アルカリ性下で光をあて、ルミフラビンを蛍光を蛍光検出器付きHPLCで総リボフラビン量として測定し、リボフラビンのモル数で示した。Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K. (1982) A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. <i>Biochem Int</i> 4 :187-194.
ビタミンB ₆	肝臓中のビタミンB ₆ はピリドキシン、ピリドキサール、PLPなどとして存在している。新鮮な肝臓組織0.1gに1mLの0.055 mol/LのHClを加え、ホモジネートした。PLPのリン酸を塩酸加水分解するために、そのホモジネートをオートクレーブにかけた(121°C、3時間)。冷却後、1 mol/LのNaOHを添加して中和した。その中和液を10,000×g、4°C、10分間遠心分離を行った。上清をビタミンB ₆ 測定用試料とした。ビタミンB ₆ は、ピリドキシンを標準物質として、 <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> strain 4228 ATCC 9080 を検定菌として測定した。値はピリドキシンのモル数として示した。The Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 17 th ed. 2000. AOAC Inc, Arlington, VA, USA : 55.
ビタミンB ₁₂	肝臓ホモジネート中のビタミンB ₁₂ をシアノコバラミンに変換処理した溶液を試料とした。ビタミンB ₁₂ は、シアノコバラミンを標準物質として、 <i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC7830 を検定菌として測定した。値はシアノコバラミンのモル数として示した。Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y. (1998) Biological activity of hydroxo-vitamin B ₁₂ degradation product formed during microwave heating. <i>J Agric Food Chem</i> 46 :5177-5180.
パントテン酸	パントテン酸は、D(+)-パントテン酸カルシウムを標準物質として、 <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 を検定菌として測定した。値はパントテン酸のモル数として示した。Skeggs HR, Wright LD. 1944. The use of <i>Lactobacillus arabinosus</i> in the microbiological determination of pantothenic acid. <i>J Biol Chem</i> 156 : 21-26.
葉酸	肝臓ホモジネートをタンパク質分解酵素で処理したのち、ポリグルタミン酸型葉酸をコンジュガータでモノグルタミン酸型葉酸に変換した溶液を試料とした。葉酸はプテロイルモノグルタミン酸を標準物質として使用し、 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 由来の <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 27773 (クローラムフェニコール耐性) を検定菌として測定した。値は、プテロイルモノグルタミン酸のモル数として示した。Aiso K, Tamura T. 1998. Trienzyme treatment for food folate analysis : Optimal pH and incubation time for α-amylase and protease treatments. <i>J Nutr Sci Vitaminol</i> 44 : 361-370.
ビオチン	新鮮あるいは凍結肝臓を解凍した肝臓0.2gに2mLの2.25 mol/LのH ₂ SO ₄ を加え、ホモゲナイズした。そのホモジネートをオート

クレープした (121°C、1 時間)。冷却後、9,000 × g、4°C、10 min の条件で遠心分離を行い、その上清を試料とした。ビオチンは、(+)-ビオチンを標準物質として使用し、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を検定菌として測定した。値はビオチンのモル数として示した。Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. 1994. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* 40: 491-498.

表 4. 尿中の水溶性ビタミンの安定化処理方法と測定方法の概略

ビタミン名と関連化合物	尿量(mL)	添加する試薬と添加量
B ₁ 、B ₂ 、B ₆ の異化代謝産物 4-PIC 葉酸	4.5	1 mol/L HCl を 0.5 mL
B ₁₂ 、パントテン酸、ビオチン	4.5	1 mol/L アスコルビン酸を 0.5 mL 原尿を使用

1 日に排泄された尿量を測定した後、一部の尿を取り出し、上記の処理を行った。処理後は -20°C にて測定するまで保存した。

- 1) ビタミン B₁ は、チアミンを測定した。値はチアミンのモル数として示した。Fukuwatari T, Suzuura C, Sasaki R, Shibata K. 2004. Action site of bisphenol A as metabolic disruptor lies in the tryptophan-nicotinamide conversion pathway. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (Japanese) **45**: 231-238.
- 2) ビタミン B₂ は、リボフラビンを測定した。値はリボフラビン量として示した。Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1983. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* **258**: 5623-5628.
- 3) ビタミン B₆ は、異化代謝産物の 4-PIC (4-ピリドキシン酸) を測定した。値は 4-PIC のモル数として示した。Rybak ME, Pfeiffer CM. 2004. Clinical analysis of vitamin B₆ determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem* **333**: 336-344.
- 4) 葉酸はアテロイルモルグルタミン酸を標準物質として使用し、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 由来の *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 (クローラムフェニコール耐性) を検定菌として測定した。値は、アテロイルモルグルタミン酸のモル数として示した。Aiso K, Tamura T. 1998. Trienzyme treatment for food folate analysis: Optimal pH and incubation time for α-amylase and protease treatments. *J Nutr Sci Vitaminol* **44**: 361-370.
- 5) ビタミン B₁₂ は、シアノコバラミンを標準物質として、*Lactobacillus leichmanii* ATCC7830 を検定菌として測定した。尿中のビタミン B₁₂ はシアノコバラミンに変換したのち測定した。値はシアノコバラミンのモル数として示した。Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y (1998) Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* **46**:5177-5180.
- 6) パントテン酸は、D(+)-パントテン酸カルシウムを標準物質として、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を検定菌として測定した。値はパントテン酸のモル数として示した。Skeggs HR, Wright LD. 1944. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* **156**: 21-26.
- 7) ビオチンは、(+)-ビオチンを標準物質として使用し、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を検定菌として測定した。値はビオチンのモル数として示した。Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. 1994. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* **40**: 491-498.

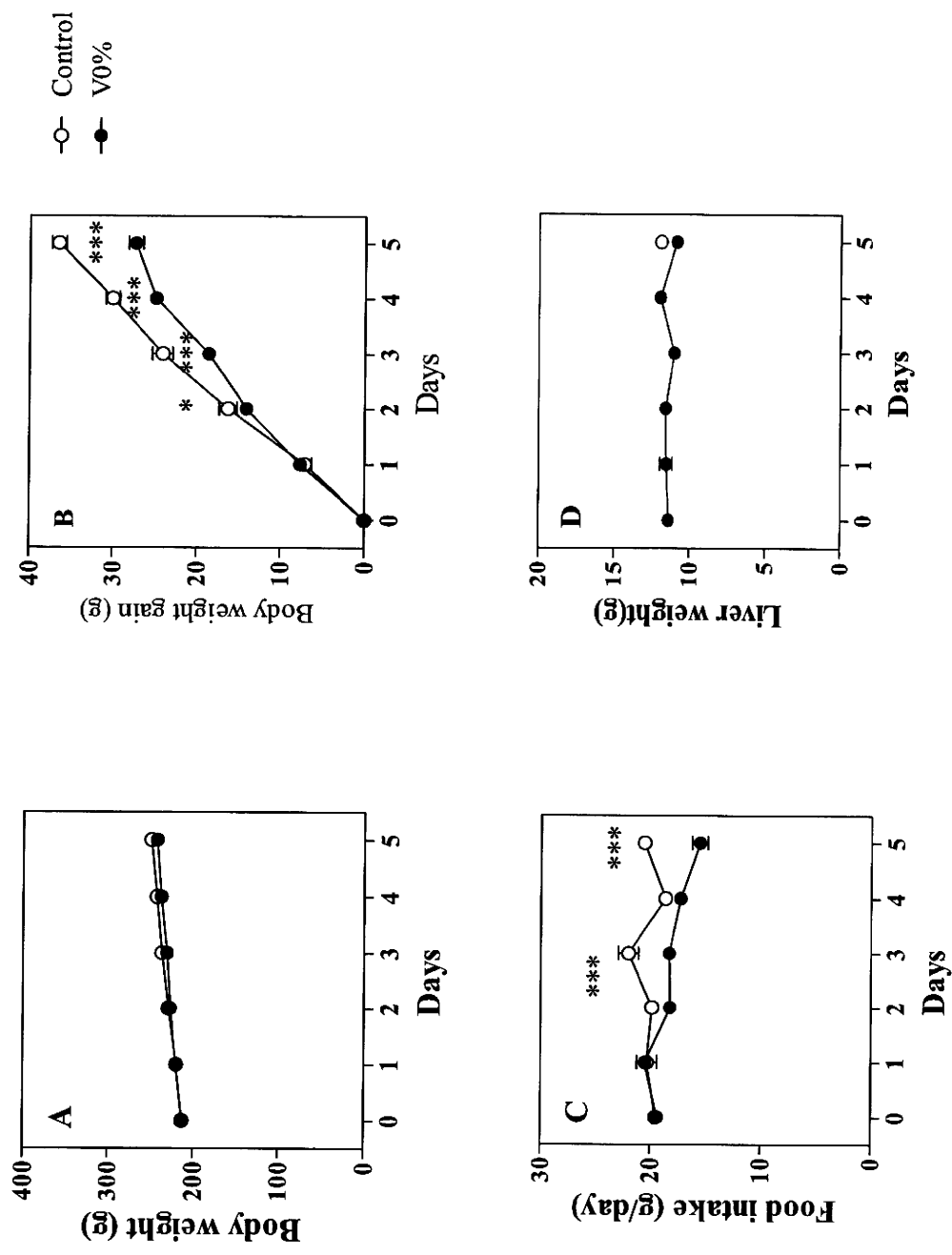


図1. ビタミン不含食投与中の体重 (A)、体重増加量 (B)、飼料摂取量 (C)、肝臓重量 (D) の変動
 *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$