

平成 15 年度厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

・ 総括研究報告

1. 平成 15 年度の成果の要約

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

1. 第六次改定日本人の栄養所要量 - 食事摂取基準 - に従った時の尿中の水溶性ビタミン値の提示とその利用
2. 生活習慣病一次予防のための日本人の食事摂取基準算定のための基礎実験
3. 食品中のビタミンの生体利用率算定のための実験
4. ナイアシンの食事摂取基準策定に関する基礎的研究
5. 母乳中のビタミン含量の測定
6. 主要な食品中のピオチン含量の測定
7. 動物を使用した許容上限摂取量の算定に関する基礎的実験
8. ビタミンB₁₂欠乏に関する研究
9. ビタミン定量方法の精度向上に関する研究
10. ビタミン必要量に影響を与える食品汚染物質の検索とその対策
11. 二度講演会を開催（高知市と京都市）
12. 第55回日本ビタミン学会で「水溶性ビタミンの食事摂取基準」という特別な分類で10題発表

1) 第六次改定日本人の栄養所要量 - 食事摂取基準 - に従った時の尿中の水溶性ビタミン値の提示とその利用

第六次改定食事摂取基準に従った精製食投与時の成人の尿中の水溶性ビタミン値を平成14年から平成15年にかけて行った計3回の実験から、水溶性ビタミン栄養状態の指標として図1に示した結論を得た。血液は一定値以上にはならない。体内には飽和量がある。健常者では一定の値を示す。必要量以下の摂取日が続き、欠乏症が顕在化する直前で、はじめて低下してくる。つまり、欠乏の診断には適している。一方、尿の値は、摂取量の低下がすぐに反映される。欠乏の予防つまり栄養状態の指標には適している。

平成13年度～15年度にかけておこなった3回の実験から、20～22歳の男女に第六次改定日本人の栄養所要量に従った合成食を投与した時の尿中の値と文献値から、栄養状態の判定のために、図2に示した対照値を設定した。記載のないビタミンに関しては、今後検討する。

この対照値の利用の一例として、これからの日本の食育の中核をなす女子学生が一般的に選択する食事を摂取した時の尿中の値を測定し、ビタミンの栄養評価を行った。この評価例の被験者は7名の女子学生で、食事は彼女らが

通常摂取している代表的な1日メニューを設定し、4日間全員同じ食事を摂らせた。その結果、図3に示したように、ビタミンB₁で8割、B₂で9割が対照値よりも低い被験者が認められた。すなわち、今回の被験者が選択した食事では、ビタミンB₁とビタミンB₂摂取量が必要量に達していないと判定した。なお、この実験期間のビタミン摂取量を実測した結果、ビタミンB₁は1日当たりで0.52 mg、B₂が0.87 mg、B₆が1.05 mg、ナイアシン当量が27.6 mg、パントテン酸が9.3 mg、ビタミンCが115 mgであった。尿中の値から判定された結果とほぼ同じ判定が得られた。これらのことから、精度が低く、面倒で、ストレスのかかる食事調査をしなくても、尿中のビタミン排泄量を測定すれば、精度高くビタミンの栄養状態を判定できることが、はじめて明確に示すことができた。

2) 生活習慣病一次予防のための日本人の食事摂取基準算定のための基礎実験
B群ビタミンの所要量は欠乏を予防する値を指標として策定されている。しかし、ビタミンCのみは、欠乏の予防が指標ではなく、抗酸化作用と疾病予防効果が期待できる血漿濃度で尿中排泄量を最小限にとどめ

る量、いわゆる生体飽和値に近い値から策定されている。B群ビタミンもビタミンCと同じ考え方で算定した場合、どの程度の量になるかを調べた。

多くのヒトは、通常の仕事をしている時は、食事から摂れる栄養素で十分であるが、非常に仕事量が増えた時、環境が悪化した時あるいは負荷がかかった時にはビタミンの必要量が増すのではないかと考えている。このような背景から、ビタミン栄養補助食品が出回っている。薬と勘違いして、ついつい即効性を期待して、大量に摂取してしまうことがある。このような背景から、食事摂取基準では許容上限摂取量の策定がなされた。悪影響がないからといって、体内飽和量を超えて摂取しても、尿中に排泄されるだけで、無駄である。そこで、女子学生6名を被検者として、水溶性ビタミンの体内飽和量を調べた。実験期間は4週間で、第1週目の1日目~4日目は食事摂取基準にほぼ従った規定食を作成し、摂取させた。尿は、4日目の24時間尿を集め、ビタミン量を分析した。第1週の5日から7日は被検者の負担軽減のために自由食とした。ただし、次のデータを得るために、水溶性ビタミン混合を所要量通り含んだパウダーを摂取させた。第2週の1日目~4日目は規定食+水溶性ビタミン混合を所要量通り含んだパウダーを摂取させた。尿は、4日目の24時間尿を集め、ビタミン量を分析した。5日目~7日目は自由食とし、水溶性ビタミン混合を所要量の3倍量含んだパウダーを摂取させた。第3週の1日目~4日目は規定食+水溶性ビタミン混合を所要量の3倍量含んだパウダーを摂取させた。尿は、4日目の24時間尿を集め、ビタミン量を分析した。5日目~7日目は自由食とし、水溶性ビタミン混合を所要量の6倍量含んだパウダーを摂取させた。第4週の1日目~4日目は規定食+水溶性ビタミン混合を所要量の6倍量含んだパウダーを摂取させた。尿は、4日目の24時間尿を集め、ビタミン量を分析した。被検者は、4日目の24時間尿の最終尿、5日目の第1回目の尿を排泄した午前6時30分頃で実験終了とした。図4のグラフは、縦軸が尿中に排泄されたナイアシン異化代謝産物量を、横軸がナイアシン当量摂取量を示す。横軸は対数表示である。二つの直線の交点が体内のナイアシン量が飽和に達し、その結果、尿中への排泄量が急激に増大したことを意味すると考えられる。ナイアシン当量の場合、500 μ mol/dayつまり、ニコチンアミドとして60 mg/dayが飽和値であることがわかった。

所要量は6.3 mg/1000 kcalであるので、単位をあわせると、34.5 mg/1000 kcalとなる。このような方法で、他のビタミンの飽和点を求めた結果をまとめたのが、図5である。この図において、二列目が第六次改定の所要量、三列目が飽和点、四列目が飽和点の量を所要量でわった時の倍数である。ビタミンB₁では2.9倍、B₂では4.6倍、B₆では3.7倍、ニコチンアミドでは5.5倍、パントテン酸では4.8倍、葉酸では3.9倍、ピオチンでは3.3倍、Cでは1.9倍であった。

3) 食品中のビタミンの生体利用率算定のための実験

食品中のビタミンがどれだけ消化・吸収・利用されているのか、すなわち生体利用率を調べるための実験方法を確立した。図6に、実験計画の概略を示した。第1週目の1日目から4日目は規定食を与えた。尿は、4日目の24時間尿を採取した。この尿に含まれるビタミン量をData 1とした。5日目~7日目は、被検者の負担を軽減するために自由食とした。ただし、1日目~4日目の食事に含まれている水溶性ビタミン量とほぼ同じ量の合成ビタミン混合を付加させた。第2週目の1日目~4日目は、第1週と同じ規定食を摂取させた。尿は、4日目の24時間尿を採取した。この尿に含まれるビタミン量をData 2とした。生体利用率の計算は、図6に示したように、Data 2の尿中ビタミンB₁排泄量から添加した合成ビタミンB₁量からData 1の尿中B₁排泄量を引いた値を、添加した合成B₁摂取量で割った値をAとした。一方で、Data 1の尿中B₁排泄量を食事中から摂取したB₁量でわった値をBとした。生体利用率はBをAで割って、100をかけた値とした。

この方法で、求めた生体利用率をまとめたものを図7に示した。ビタミンB₁は平均値で66%、最小値が42%で最大値が87%であった。B₂は64%で、41~90%の値であった。B₆は75%で、66~80%の値であった。ナイアシンは70%で、35~80%であった。パントテン酸は70%で、51~78%であった。

4) ナシアシンの食事摂取基準策定に関する基礎的研究

4-1) ニコチンアミドは *de novo* ニコチンアミド合成経路を阻害しない

水溶性ビタミンには特殊なビタミンがある。ナイアシンであるが、トリプトファンから生合成されている。このことが、ナイ

アシンの所要量策定の精度に大きく影響を与えている。図8にトリプトファン-ナイアシン生合成経路の概略を示した。

de novo 生合成経路においては、最終産物が中間代謝酵素を阻害することによって、体内濃度の恒常性を維持している。我々は、トリプトファン-ナイアシン転換率が多く栄養因子によって変動することを証明してきた。しかしながら、この *de novo* ニコチンアミド合成経路が摂取ニコチンアミド量によって影響を受けるか否かについては調べていなかった。実験方法は、基本的には、水溶性ビタミンの体内飽和量を求めた時の実験方法と同じである。結果は図9に示した。図9-Fに示したように、ニコチンアミド異化代謝産物は摂取量の増大に伴って増大した。この事実は、確かにニコチンアミドが体内に摂取され、代謝されていることを示している。このような状態でも、図9-A~Eに示したように、トリプトファン-ナイアシン生合成中間代謝産物量は、摂取ニコチンアミド量の増大によって変動しなかった。この結果は、*de novo* ニコチンアミド合成経路はニコチンアミドの摂取量とは関係なく作動していることを意味しており、ニコチンアミドの摂取量に応じて、トリプトファン-ナイアシン転換効率を変動させる必要がないことがはじめて明らかとなった。

4-2) トリプトファン-ニコチンアミド転換効率

トリプトファン-ナイアシン転換効率は、栄養因子によって大きく変動する。そこで、第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-に従った時のトリプトファン-ナイアシン転換効率を調べた。被検者は10名の女子学生である。実験期間は7日間で、毎日採尿を行い、経日変動も調べた。食事は合成食で、この食事には全くナイアシンそのものは含まれていない。図10-Aは個人の値をプロットしたもので、Bと書いてあるグラフが平均値である。縦軸の数値の見方は、60という数値は60mgのトリプトファンから1mgのナイアシンが生合成されているという意味である。数字が小さいほど効率が高いことを意味する。Day1~Day3で効率が低いのは、実験開始前には通常食事であるので、ナイアシンそのものを摂取しており、そのために効率は高くでていた。しかし、Day4からはほぼ一定の値となった。つまり、前歴の食事の影響がなくなり、実験食の結果のみを反映してきたことを意味する。この時のトリプトファン-ナイアシン活性効率は、70mgのトリブ

トファンが1mgのナイアシンと当価であるというものであった。第六次で採用されている60mgのトリプトファンが1mgのナイアシンと当価であるという値とほぼ同じであった。

5) 母乳中のビタミン含量の測定

乳児の所要量の精度向上のために、母乳中の水溶性ビタミン含量を測定した。

6) 主要な食品中のビオチン含量の測定

ビオチンは、種々の食品に広く分布している。しかし、ビオチンは、五訂日本食品標準成分表には収載されておらず、食品中の含量をはじめとして、食品中での存在状態、調理や加工による変化、生体内における利用率についてなど、ほとんど明らかにされていない。そこで、日常的に摂取している代表的な100食品について、食品中のビオチン含有量を分析し、諸外国の食品中ビオチン量と比較検討した。この結果、食品によって、ビオチン含量や遊離ビオチン率に大きな相違がみられ、生物有効性に差異のある可能性が示唆された。また、鶏卵では、卵黄中の遊離ビオチン率が高値を示し、卵黄がビオチンの供給源として有用な食品であることが示唆された。なお、家禽の卵黄には多量のビオチンが存在したが、魚卵のビオチン濃度は低値であった。これは、加工処理後の残存率が低い可能性もあり、今後検討が必要である。一方、デンマークやカナダの食品成分表には、それぞれ約100種類の食品のビオチン量が示されている。これらのビオチン含量については大きな相違は認められず、わが国においてこれらの食品のビオチン含量も利用が可能である。

7) 動物を使用した許容上限摂取量の算定に関する基礎的実験

過剰毒性を示す実験は、ヒトではできない。そこで、幼若ラットを用いて短期毒性実験を行った。毒性の指標としては、特に、ビタミン代謝のかく乱を重視しておこなった。ビタミンB₁とB₂は飼料中に1%添加しても悪影響は認められなかった。パントテン酸は0.5%の添加までは悪影響は認められなかったが、1%では認められた。ニコチンアミドの許容上限量の評価は、尿中にニコチンアミドN-オキシドの検出が利用できることを明らかにした。

8) ビタミンB₁₂欠乏の影響

ラットを用いて、ビタミンB₁₂欠乏の精

子形成に及ぼす影響を、胎生期から成熟までの発育段階において検討した。ビタミン B₁₂ は精子形成に不可欠であり、とくに、精母細胞の分裂や精子の成熟に関与していることが示唆された。

9) ビタミン定量方法の精度向上に関する研究
アスコルビン酸測定 of 精度を上げるための研究を行い、成果を得た。

10) ビタミン必要量に影響を与える食品汚染物質の検索とその対策

内分泌攪乱物質の候補に挙がっている物質がビタミンの必要量に及ぼす影響を調べ、成果を上げた。

11) 講演会

11-1) 「第 4 回日本人の水溶性ビタミンの必要量: 元気なカラダとビタミン摂取 - 水溶性ビタミンの必要量について - 」を開催

実施日: 平成 15 年 11 月 22 日 (土) 13 時 ~ 17 時

実施場所: 高知女子大学 (高知市)

11-2) 「第 5 回日本人の水溶性ビタミンの必要量: 食品中のビタミンはどれくらい吸収・利用されるのか」を開催

実施日: 平成 16 年 2 月 21 日 (土) 13 時 ~ 17 時

実施場所: 財団法人総合交流事業団 京都テルサ (京都市)

12) 第 55 回日本ビタミン学会で「水溶性ビタミンの食事摂取基準」という特別なセッションで 10 題発表

1. 目的と実験方法
2. ビタミン B₁
3. ビタミン B₂
4. ビタミン B₆
5. ビタミン B₁₂
6. ナイアシン
7. パントテン酸
8. 葉酸
9. ビオチン
10. ビタミン C

研究成果の意義及び今後の発展性

第六次改定で示された水溶性ビタミン量を摂取させれば、臨床的に使用されている欠乏の基準値以上の数値を示したことから、欠乏を予防するという観点からみれば、完璧な数値策定であることが判明した。日本にはもはや水溶性ビタミン欠乏はみられず、欠乏症を予防するための数値に関する研究は必要はない。しかしながら、日本食はビタミン B₁ と B₂ の摂取量不足が見られやすいことが判明した。指導が必要で

ある。

生活習慣病を予防するという観点から、水溶性ビタミンの体内の飽和値を求めた。今後、これらの飽和値量のビタミン量摂取時に、生活習慣病と関連性が高い臨床指標がどのような値を示すかを検討し、生活習慣病予防との関係を明確にしていきたい。

利便性の高いサプリメントの普及のため、許容上限摂取量の設定が急務である。動物実験から推定した値の換算係数の決定が必要である。ニコチンアミドで得られた結果のように、過剰になれば、新規な異化代謝産物が検出される方法が最も良い。このためには、ビタミンの異化代謝経路をまず明らかにする研究が必要である。

得られた成果を第 7 次改定日本人の食事摂取基準に利用することができた。

倫理面への配慮

本研究は、国立健康・栄養研究所の倫理委員会規約第 6 条に基づき、審議を経て承認された後に、ヘルシンキ宣言、および、本研究所倫理委員会規定に従って実施するほか、各研究施設の倫理委員会規定に従って実施する。動物実験は、滋賀県立大学における動物実験に関する指針第 5 条に基づき、動物実験委員会に、動物実験計画申請書を提出し、審議を経て許可された後に行った。

発表論文

1. 福渡努, 斉藤智恵, 佐々木隆造, 柴田克己. (2003) ラットにおけるインスタントコーヒーのナイアシン活性. 日本家政学会誌, **54**, 77-82
2. Kimura N, Fukuwatari T, Sasaki R, Hayakawa F, Shibata K. (2003) Vitamin intakes in Japanese college women students. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **49**:149-155.
3. 渡辺敏明, 前田邦彦, 渡辺義孝, 榎原周平, 中野長久. (2003) 雄ラットの発育に伴うビタミン B₁₂ 欠乏状態の精子形成に及ぼす影響. *微量栄養素*, **20**:55-59.
4. Ihara H, Shino Y, Hashizume N, Hirano A, Okada, M. (2003) The assay of ascorbic acid in serum is not affected by physiological concentrations of transferrin and hemoglobin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **49**:289-291.
5. Ihara H, Shino Y, Hashizume N. (2003) Optimum concentration of metaphosphoric acid as the deproteinizing

- reagent for enzymatic analysis of ascorbic acid in serum. *J. Anal. Bio-Sci.*, **26**:365-368
6. 渭原博, 橋詰直孝 . (2003) EBM に基づいたビタミン欠乏症の判定 . *臨床病理レビュー*, 特集第 127 号, 24-30.
 7. 渭原博, 篠良雄, 松本信明, 橋詰直孝 . (2003) 検査室からみた血中ビタミン測定 . *臨床検査*, **32**:274-279.
 8. 橋詰直孝, 渭原博, 志越顕, 谷晴仁 . (2003) 高カロリー輸液の臨床輸液モデルにおけるビタミン B₁ の安定性 . *日本臨床栄養学会雑誌*, **24**:208-211.
 9. Fukuwatari T, Wada H, Sasaki R, Shibata K. (2004) Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide *N*-oxide and nicotinuric acid in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 44-50.
 10. Ohta M, Kitamura J, Fukuwatari T, Sasaki R, Shibata K. (2004) Effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in mice. *Experimental Animals* **53**: 57-60.
 11. 福渡努, 鳥落舞, 佐々木隆造, 柴田克己 . (2004) 内分泌攪乱物質候補ビスフェノール A, スチレンモノマーによるトリプトファン - ニコチンアミド転換経路攪乱作用 . *食品衛生学会誌*, **45**: 1-7.
 12. Fukuwatari T, Ohta M, Sugimoto E, Sasaki R, Shibata K. (2004) Effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate, a putative endocrine disrupter, on enzyme activities involved in the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biochim. Biophys. Acta* in press

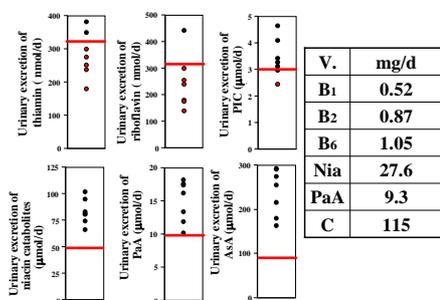
研究組織

研究者名	分担する研究項目	最終卒業学校・卒業年次・学位及び専攻科目	所属機関及び現在の専門（研究場所）	所属機関における職名
主任研究者 柴田克己	統括，ビタミンB ₁ ，B ₂ ，B ₆ ，ナイアシン，パントテン酸，ビタミンCの必要量	京都大学大学院 昭和54年 農学博士 食品工学	滋賀県立大学 人間文化学部 食品・栄養生化学 (滋賀県立大学)	教授
分担研究者 橋詰直孝	統括補佐 ビタミン測定方法の精度管理	東邦大学医学部 昭和41年 医学博士 医学	東邦大学医学部 臨床検査医学 (東邦大学)	教授
分担研究者 渡邊敏明	ビオチン，ビタミンB ₁₂ ，葉酸の必要量	新潟大学大学院 昭和50年 理学博士 医学博士 理学	姫路工業大学・環境人間学部 (姫路工業大学)	教授
分担研究者 西牟田守	ビタミン必要量実験の担当医師． 高齢者の血液・尿試料採取．	東京慈恵会医科大学 昭和50年 医学博士 医学	国立健康・栄養研究所 人体生理学 (国立健康・栄養研究所)	室長
分担研究者 戸谷誠之	泌乳量の調査と母乳集め．	名古屋市立大学大学院 昭和48年 医学博士 医学	昭和女子大学大学院生活機構研究科 検査医学 (昭和女子大学)	教授

栄養状態の指標

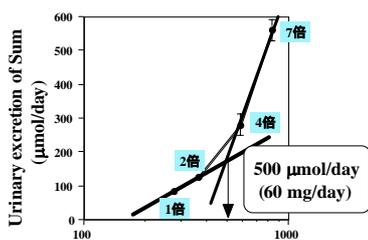
血液	<ul style="list-style-type: none"> ●一定値以上にはならない(体内には飽和量がある)．健康者では一定の値を示す． ●必要量以下の摂取日が続き、欠乏症が顕在化する直前で、はじめて低下してくる． ●欠乏の診断には適している．
尿	<ul style="list-style-type: none"> ●摂取量の低下がすぐに反映される．欠乏の予防つまり栄養状態の指標には適している．

図1．栄養状態の指標



女子学生が選択した一定の食事を選択させた時の尿中の水溶性ビタミン排泄量

図3．尿中へのビタミン排泄量を指標とした栄養状態の判定の一例



体内の飽和量を求めるための実験

図4．体内の水溶性ビタミンの飽和量を求めるための実験例 - ナイアシン -

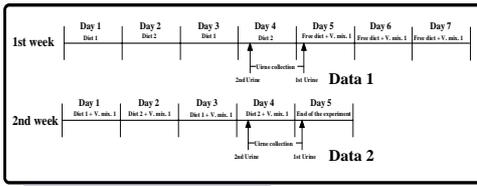
ビタミン栄養状態の対照値

ビタミン名	尿
B ₁	>333nmol/d
B ₂	>319nmol/d
B ₆	>3.0 μmol/d
ナイアシン	>50 μmol/d
パントテン酸	>10 μmol/d
C	>90 μmol/d

図2．ビタミン栄養状態の対照値

ビタミン名	第六次改定の所要量	飽和点	倍数
ビタミンB ₁	0.42 mg/1,000kcal	1.2 mg/1,000kcal	2.9
ビタミンB ₂	0.48 mg/1,000 kcal	2.2 mg/1,000 kcal	4.6
ビタミンB ₆	0.017 mg/g protein	0.066 mg/g protein	3.7
ビタミンB ₁₂	0.0024 mg/day	?	?
ニコチンアミド	6.3 mgNE/1,000 kcal	34.5 mgNE/1,000 kcal	5.5
パントテン酸	5 mg/day	24 mg/day	4.8
葉酸	0.2 mg/day	0.78 mg/day	3.9
ピオチン	0.03 mg/day	0.10 mg/day	3.3
ビタミンC	100 mg/day	190 mg/day	1.9

図5．体内の飽和量を指標とした時の必要量



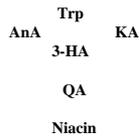
生体利用率 (%) の計算方法

$$A = \frac{(\text{Data 2の尿中B}_1\text{排泄量} - \text{Data 1の尿中B}_1\text{排泄量})}{\text{添加した合成B}_1\text{量}}$$

$$B = \frac{\text{Data 1の尿中B}_1\text{排泄量}}{\text{食事の中のB}_1\text{量}} \quad \text{生体利用率}(\%) = (B/A) \times 100$$

図6. 食品中のビタミンの生体利用率を求めるための実験方法

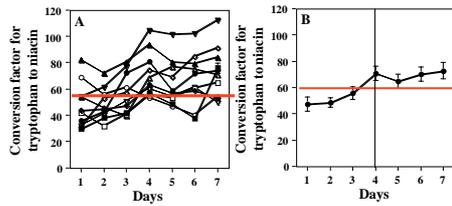
ナイアシンの必要量に関する基礎的研究の結果



ナイアシンはトリプトファンから生成される

図8. トリプトファン - ナイアシン代謝

食事摂取基準に従った栄養素を摂取した時の転換率



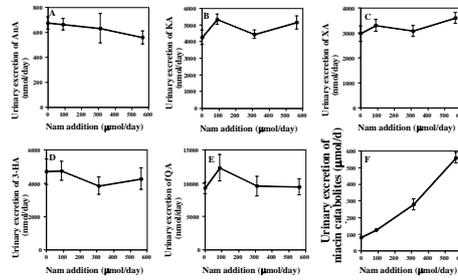
トリプトファンのナイアシン当量値

図10. トリプトファン - ナイアシン転換効率

食品中のビタミンはどれくらい吸収・利用？
- 生体利用率 -

ビタミン名	生体利用率
ビタミンB1	66% (42 ~ 87)
ビタミンB2	64% (41 ~ 90)
ビタミンB6	75% (66 ~ 80)
ナイアシン	70% (35 ~ 80)
パントテン酸	70% (51 ~ 78)

図7. 女子学生が選択する典型的な食事のビタミンの生体利用率



ニコチンアミドの付加は*de novo*ニコチンアミド合成経路に影響を与えない

図9. ニコチンアミド*de novo*ニコチンアミド合成系に及ぼす影響