

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

・ ヒトを用いた水溶性ビタミン食事摂取基準の検討

1. 尿中への排泄量からみた水溶性ビタミンの栄養評価（女子学生）

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

女子学生が選択する一般的な食事メニューを、4 日間摂取させ、実験開始 4 日の 24 時間尿を採取し、水溶性ビタミン量を測定した。その結果、尿中ビタミン B<sub>1</sub> 排泄量は  $283 \pm 68.9$  nmol/day (mean  $\pm$  SD)、ビタミン B<sub>2</sub> は  $248 \pm 102$  nmol/日、ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物である 4-ピリドキシン酸は  $3.44 \pm 0.73$   $\mu$ mol/日、ナイアシン異化代謝産物は  $83.6 \pm 12.0$   $\mu$ mol/日、パントテン酸は  $15.0 \pm 3.16$   $\mu$ mol/日、ビタミン C は  $239 \pm 53.0$   $\mu$ mol/日であった。基準値と比較して、ビタミン B<sub>1</sub> は被験者 7 名中 5 名が、ビタミン B<sub>2</sub> は 7 名中 6 名が、ビタミン B<sub>6</sub> は 6 名中 1 名が、基準値よりも低い値を示した。ナイアシン異化代謝産物量、パントテン酸、ビタミン C は、全員が基準値以上の値であった。この実験期間 4 日間の平均ビタミン B<sub>1</sub> 摂取量は 0.53mg/日、ビタミン B<sub>2</sub> は 0.87mg/日、ビタミン B<sub>6</sub> は 0.40mg/日、ナイアシン当量は 27.6mg/日、パントテン酸は 9.29mg/日、ビタミン C は 115mg/日であった。つまり、女子学生が一般的に摂取している食事では、ビタミン B<sub>1</sub> と B<sub>2</sub> が摂取しにくいことが明らかとなった。以上のことから、尿中の値から判定された結果と食事摂取量での判定とほぼ同じ判定が得られた。このことは、精度が低く、面倒で、ストレスのかかる食事記録を行わなくても、尿中のビタミン量を測定すれば、精度高くビタミンの栄養状態を判定できることが、初めて明確に示すことができた。

A. 目的

第六次改定日本人の栄養所要量に従った半合成食（ビタミンはすべて化学的合成品なる混合物）を日本人成人男女に投与した時の血液中、尿中の値を測定し、臨床検査領域において欠乏と診断される基準値と比較した。その結果、すべての水溶性ビタミンで欠乏と診断される基準値以上の値を示し、第六改定日本人の栄養所要量の値は、欠乏を予防するための数値としては、完全であることをはじめて科学的に明らかにした（平成 13 年度～14 年度の成果、1）。さらに、Table 1 に示したように、欠乏の診断においては、血液中のビタミン含量を測定する方がよいが、栄養状態の指標とするには尿の方が適していることを示した。臨床指標は血液の値しか示されていなかったため、我々の研究班がはじめて、水溶性ビタミンの栄養状態の指標として、尿中の値の基準値を示すことができた。そこで、この値を使用して、次世代の子供を産み、育て、かつ食育の中心的な役割を果たす管理栄養士施設の女子学生が普段食しているものを摂取した時の、水溶性ビタミンの尿中排泄量を測定し、栄養評価の例を示したので、報

告する。

B. 実験方法

被験者

女子学生を被験者とした。被験者の身体的特徴を Table 2 に示した。

食事

2 種類の食事を摂取させた。その栄養素成分は Table 3 と Table 4 に示した。ビタミン B<sub>12</sub> を除く 7 種類の水溶性ビタミンは実測値である。他は五訂日本食品標準成分表を用いて、計算した。

実験計画

概略を Fig. 1 に示した。

採尿は、day 4 に行った。蓄尿中の尿は氷中に保存し、24 時間尿の採取後、直ちに容量を測定した。水溶性ビタミンは化学構造上の違いから、安定化条件が異なる。ビタミン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> とナイアシンとその異化代謝産物測定のためには、尿 9 ml に 1 mol/L HCl を添加した後、-20℃ で保存した。ビタミン C は、尿 5 ml に 10%メタリン酸 5 ml を加え、-20℃ で保存した。ビタミン B<sub>6</sub>、パントテン酸、葉酸は尿をそのまま凍結して保存した。

分析方法

ビタミン B<sub>1</sub>

尿中のビタミン B<sub>1</sub> 定量方法に記した方法に従って行った。

#### ビタミン B<sub>2</sub>

尿中のビタミン B<sub>2</sub> 定量方法に記した方法に従って行った。

#### ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物 4-ピリドキシン酸

尿中の 4-ピリドキシン酸定量方法に記した方法に従って行った。

#### ナイアシンの異化代謝産物 MNA, 2-Py, 4-Py

尿中の MNA, 2-Py, 4-Py 定量方法に記した方法に従って行った。

#### パントテン酸

尿中のパントテン酸定量方法に記した方法に従って行った。

#### ビタミン C

尿中のビタミン C 定量方法に記した方法に従って行った。

#### C. 結果

女子学生が選択する一般的な食事メニューを、4 日間摂取させ、実験開始 4 日目の 24 時間尿を採取し、水溶性ビタミン量を測定し、前年度の成果で報告した第六次改定日本人の栄養所要量に従った半合成食を投与した時の値を対照値（平成 14 年度の成果報告書）として、女子学生が通常摂取する食事の水溶性ビタミン評価を行った。その結果を Table 4 と Fig. 2 に示した。

#### ビタミン B<sub>1</sub>

4 日間の平均ビタミン B<sub>1</sub> 摂取量は 0.53mg/日であった。五訂日本人の食品標準成分表に基づいた計算値は、0.76 mg/日であった。実際に摂取したビタミン B<sub>1</sub> 量が必要量に比して少なかったため、基準値と比較して、ビタミン B<sub>1</sub> は被験者 7 名中 5 名が低値を示した。

#### ビタミン B<sub>2</sub>

4 日間の平均ビタミン B<sub>2</sub> 摂取量は 0.87mg/日であった。五訂日本人の食品標準成分表に基づいた計算値は、1.1 mg/日であったが、食品中の実測値は上述のように、約 80% 値であった。ビタミン B<sub>2</sub> は 7 名中 6 名が、対照値よりも低値を示した。

#### ビタミン B<sub>6</sub>

4 日間の平均ビタミン B<sub>6</sub> 摂取量は、五訂日本人の食品標準成分表に基づいた計算値は 1.0 mg/日であったが、食品中の実測値もほとんど同じで 1.1mg であった。ビタミン B<sub>6</sub> は 6 名中 1 名が、対照値よりも低値を示した。

#### ナイアシン

4 日間の五訂日本人の食品標準成分表に基づいた計算値は 27.1 mg/日であったが、食品

中の実測値もほとんど同じで 27.6mg/日であった。ナイアシン異化代謝産物量の合計値は全員が対照値以上の値を示した。

#### パントテン酸

4 日間の五訂日本人の食品標準成分表に基づいた計算値は、5.0 mg/日であったが、食品中の実測値は 9.3 mg/日であった。パントテン酸排泄量は全員が対照値以上の値を示した。

#### ビタミン C

4 日間の五訂日本人の食品標準成分表に基づいた計算値は 115 mg/日であったが、食品中の実測値は 105 mg/日であった。ビタミン C 排泄量は全員が対照値以上の値を示した。

#### D. 考察

実測したビタミン B<sub>1</sub> と B<sub>2</sub> の摂取量は、食品成分表を基に計算した値より低く、60 ~ 70% の値であった。ほとんど場合、栄養士は食品成分表からビタミンの摂取量を計算するため、この差異は重要な問題である。日本での多くの食事調査では、ビタミン B<sub>1</sub> も B<sub>2</sub> も摂取量が食事摂取基準を満たしているのに、逆に尿中の値が対照値よりも低値を示す場合が多いのは、実際に摂取した量が少ないためであるということが推測された。

以上のことより、尿中の値から判定された結果と食事摂取量での判定とほぼ同じ判定が得られた。このことは、精度が低く、面倒で、ストレスのかかる食事記録を行わなくても、尿中のビタミン量を測定すれば、精度高くビタミンの栄養状態を判定できることが、初めて明確に示すことができた。

#### E. 健康危険情報

特記する情報はない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 口頭発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許予定

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### H. 引用文献

1. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Tsuge H, Isa Y, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M,

Ihara H, Hashizume N (2004) The values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women fed on a semi-purified diet followed by the

Japanese Dietary Reference Intakes. J Nutr Sci Vitaminol 50: in press.

Table 1. 栄養状態の指標

血液	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 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。</li> <li>● 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。</li> <li>● 欠乏の診断には適している。</li> </ul>
尿	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 摂取量の低下がすぐに反映される。欠乏の予防には適している。</li> <li>● 排泄量は代謝量を反映しているので,基準値を示すことで,基準値に達した時の摂取量が適正必要量であると考えることができる。</li> </ul>

Table 2. Characteristics of the Subjects.

Subjects	Age (Yr)	Height (cm)	Body weight (kg)	BMI
Female 1	21	161.0	50.0	19.29
Female 2	21	161.0	52.5	20.25
Female 3	21	162.0	46.0	17.53
Female 4	28	168.0	55.0	19.49
Female 5	22	154.0	48.0	20.24
Female 6	21	160.5	53.0	20.57
Female 7	21	165.0	52.5	19.28
Mean	22.14	161.3	51.0	19.52
SD	2.61	4.3	3.2	1.02

Table 3. The Composition of the Diet 1.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	402	689	617	1784
Protein (g)	19.5	23.8	25.2	68.6
Fat (g)	15.7	25.5	9.6	50.8
carbohydrates (g)	46.0	85.8	104.4	248.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	150	309	419	878
Vitamin D (μg)	1	0	2	3
Vitamin E (mg)	1.1	2.1	2.4	5.6
Vitamin K (μg)	8	204	98	311
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.17	0.07	0.59
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.20	0.25	0.92
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.36	0.68	1.24
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	3.45	8.42	18.48	30.35
Pantothenic acid (mg)	1.97	4.21	3.14	9.32
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	34	50	118
Minerals				
Na (mg)	794	1175	850	2845
K (mg)	592	601	625	1993
Ca (mg)	249	142	85	479
Mg (mg)	47	71	74	192
P (mg)	380	293	317	1071
Fe (mg)	0.8	3.4	2.6	6.7
Zn (mg)	1.8	3.7	2.5	8.0
Cu (mg)	0.15	0.44	0.43	1.02

<sup>1</sup>Water-soluble vitamins are measured. Other nutrients are calculated by using the Standard Tables of Food Composition in Japan, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<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.

Table 4. The Composition of the Diet 2.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	463	549	606	1693
Protein (g)	19.6	21.4	20.5	61.5
Fat (g)	22.3	12.8	10.0	45.0
carbohydrates (g)	46.1	85.6	105.5	249.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	294	144	444	882
Vitamin D (μg)	1	0	0	1
Vitamin E (mg)	2.7	0.6	2.9	6.2
Vitamin K (μg)	12	98	100	210
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.09	0.02	0.46
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.18	0.17	0.81
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.35	0.31	0.86
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	7.04	8.08	9.67	24.79
Pantothenic acid (mg)	1.97	3.73	3.55	9.25
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	25	53	112
Minerals				
Na (mg)	833	1237	1080	3177
K (mg)	594	851	615	2235
Ca (mg)	250	173	96	523
Mg (mg)	47	113	96	257
P (mg)	381	253	317	1032
Fe (mg)	0.8	6.2	3.2	10.2
Zn (mg)	1.9	2.8	4.2	8.9
Cu (mg)	0.15	0.33	0.47	0.95

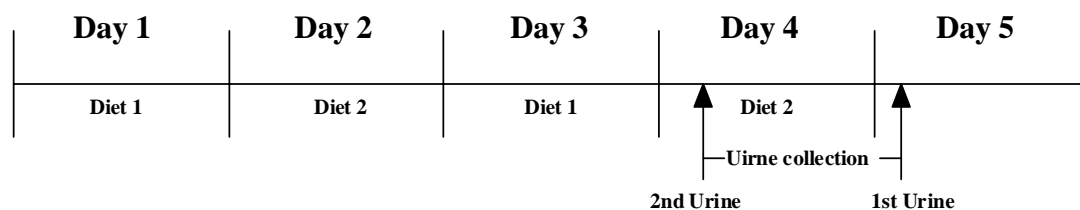
<sup>1</sup>Water-soluble vitamins are measured. Other nutrients are calculated by using the Standard Tables of Food Composition in Japan, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<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.

Table 5. The Values of Mean, SD, SEM, and CV of Water-soluble Vitamins in Urine of Japanese College Women Students Fed on an Ordinary Diet.

	Mean	SD	SEM	CV <sup>1</sup>
Total thiamin (nmol/day)	283	68.9	26.1	24.4
Total riboflavin (nmol/day)	248	102	38.5	41.0
Pyridoxic acid (μmol/day)	3.44	0.73	0.28	21.3
Sum (MNA+2-Py;4-Py) (μmol/day)	83.6	12.0	4.53	14.3
Total PaA (μmol/day)	15.0	3.16	1.19	21.0
Ascorbic acid (μmol/day)	239	53.0	20.0	22.2

<sup>1</sup>CV is expressed as %.



Subjects: college students (7 women, aged from 21-28 years olds)  
 Diet: Normal diets were fed on the subjects  
 Collected materials: urine  
 Analyzed compounds: water-soluble vitamins .  
 Experimental days: 5 days, the day begins 07:00 and ends the next 07:00.

Fig. 1. The Scheme of the Experimental Design.

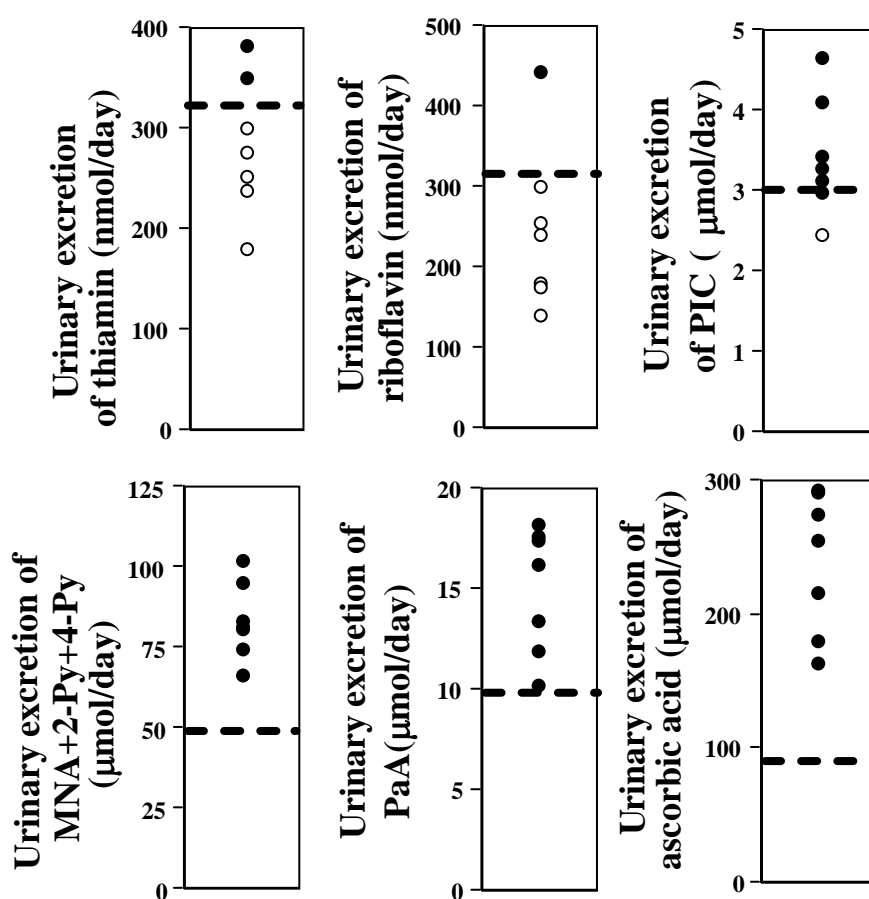


Fig. 2. Urinary Excretions of Thiamin, Riboflavin, PIC, Sum of the niacin catabolites, Pantothenic Acid, and Ascorbic Acid in Japanese Females.

The heavy line in each graph indicates the reference value. Thiamin, >333 nmol/day; riboflavin, >319 nmol/day; PIC, >3.0 μmol/day; Sum of the niacin catabolites, >50 μmol/day; ascorbic acid, >90 μmol/day. Closed circles are above the reference value and open circles are below the reference value.

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

・ヒトを用いた水溶性ビタミン食事摂取基準の検討

2．ヒトにおける水溶性ビタミンの摂取量と尿中への排泄量との関係

－体内飽和量を求めるための研究－

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

ある種の疾病がビタミン欠乏に起因することが20世紀初頭から半世紀をかけて明らかにされてきた。20世紀の後半は、ビタミン欠乏症を予防するにはどの程度のビタミン摂取が必要であるかが明らかにされた。20世紀末には、ビタミンCに欠乏症である壊血病を予防する生理機能だけではなく、あらたに抗酸化作用と疾病予防が期待できることが明らかにされ、ビタミンの機能が新たに注目されてきた。ビタミンCは、血漿中の濃度が200 mg/日の投与で飽和するという報告がある。しかしながら、他の水溶性ビタミンに関する報告はない。そこで、体内飽和量を示す値を求めるために、ヒトを使用して、実験を行った。被験者には第1週目には通常食（ほぼ第六次改定日本人の栄養所要量にしたがった食事組成）、2週目には通常食+1倍量のビタミン混合（水溶性ビタミン所要量）、3週目には通常食+3倍量のビタミン混合、4週目には通常食+6倍量のビタミン混合を投与した。各週の4日の24時間尿を採取し、水溶性ビタミン含量を測定した。その結果、ビタミンB<sub>1</sub>の飽和量は1.2 mg/1000 kcalで所要量の2.9倍であった。ビタミンB<sub>2</sub>は2.2 mg/1000 kcalで4.6倍、ビタミンB<sub>6</sub>は0.066 mg/g たんぱく質で3.7倍、ナイアシンは34.5 mg/1000 kcalで5.5倍、パントテン酸は24 mg/日で4.8倍、葉酸は0.78 mg/日で3.9倍、ビオチンは0.10 mg/日で3.3倍、ビタミンCは190 mg/日で1.9倍であった。



## A. 研究目的

日本では、江戸から明治、大正にかけて国民を悩ましたビタミンB<sub>1</sub>欠乏症の脚気があった。この脚気の原因については、ビタミンB<sub>1</sub>欠乏に起因することが19世紀末から半世紀をかけて明らかにされてきた。このビタミンB<sub>1</sub>欠乏症の取り組みがきっかけとなり、20世紀前半はビタミンの発見ラッシュの時代であった。20世紀の後半は、ビタミン欠乏症を予防するにはどの程度のビタミン摂取が必要であるかが明らかにされ、必要量の普及活動などにより、日本ではビタミン欠乏症は、姿を消した。そのため、国民の多くから、ビタミン欠乏に対する恐怖心は消え去り、ビタミンに対する関心も薄れてきた。その様な時、20世紀末には、ビタミンCに欠乏症である壊血病を予防する生理機能だけではなく、あらたに抗酸化作用と疾病予防が期待できることが明らかにされ、ビタミンの機能があらたに注目されてきた。すなわち、ビタミンには健康の増進や種々の疾病予防に効果があることがわかってきた。ビタミンCは、血漿中の濃度が200 mg/日の投与で飽和するという報告がある<sup>1)</sup>。しかしながら、他の水溶性ビタミンに関する報告はない。そこで、体内飽和量を示す値を求めるために、ヒトを使用して、実験を行った。

## B. 実験方法

### 被験者

女子学生を被験者とした。被験者の身体的特徴をTable 1に示した。

### 食事

2種類の食事を摂取させた。その栄養素成分はTable 2とTable 3に示した。ビタミンB<sub>12</sub>を除く7種類の水溶性ビタミンは実測値である。他は五訂日本食品標準成分表を用いて、計算した。

### 実験計画

概略をFig. 1に示した。実験期間は4週間であり、第1週はTables 2と3に示した食事のみを与えた。第2週は食事+1日当たり第六次改定日本人の栄養所要量で示された量の水溶性ビタミン混合を与えた。第3週は食事+1日当たり所要量の2倍量の水溶性ビタミン混合を与えた。第4週は食事+1日当たり所要量の6倍の水溶性ビタミン混合を与えた。服用させたビタミン混合は朝食：昼食：夕食=3：4：3の割合で、食後すぐに摂取させた。

採尿は、いずれの週もday 4に行った。蓄

尿中の尿は氷中に保存し、24時間尿の採取後、直ちに容量を測定した。水溶性ビタミンは化学構造上の違いから、安定化条件が異なる。ビタミンB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>とナイアシンとその異化代謝産物測定のためには、尿9 mlに1 mol/L HClを添加した後、-20℃で保存した。ビタミンCは、尿5 mlに10%メタリン酸5 mlを加え、-20℃で保存した。ビタミンB<sub>6</sub>、パントテン酸、葉酸、ビオチンは、尿をそのまま-20℃で保存した。

### 分析方法

#### ビタミンB<sub>1</sub>

尿中のビタミンB<sub>1</sub>定量方法に記した方法に従って行った。

#### ビタミンB<sub>2</sub>

尿中のビタミンB<sub>2</sub>定量方法に記した方法に従って行った。

#### ビタミンB<sub>6</sub>の異化代謝産物 4-ピリドキシン酸

尿中の4-ピリドキシン酸定量方法に記した方法に従って行った。

#### ナイアシンの異化代謝産物 MNA, 2-Py, 4-Py

尿中のMNA, 2-Py, 4-Py定量方法に記した方法に従って行った。

#### パントテン酸

尿中のパントテン酸定量方法に記した方法に従って行った。

#### 葉酸

尿中の葉酸定量方法に記した方法に従って行った。

#### ビオチン

尿中のビオチン定量方法に記した方法に従って行った。

#### ビタミンC

尿中のビタミンC定量方法に記した方法に従って行った。

## C. 結果

#### ビタミンB<sub>1</sub>

Fig. 2に示したように、ビタミンB<sub>1</sub>の飽和量は1.2 mg/1000 kcalで所要量の2.9倍であった。

#### ビタミンB<sub>2</sub>

Fig. 3に示したように、ビタミンB<sub>2</sub>は2.2 mg/1000 kcalで所要量の4.6倍であった。

#### ビタミンB<sub>6</sub>

Fig. 4に示したように、ビタミンB<sub>6</sub>は0.066 mg/gたんぱく質で所要量の3.7倍であった。

#### ナイアシン

Fig. 5に示したように、ナイアシンは34.5 mg/1000 kcalで所要量の5.5倍であった。

#### パントテン酸

Fig. 6に示したように、パントテン酸は24 mg/日で所要量の4.8倍であった。

#### 葉酸

Fig. 7 に示したように，葉酸は 0.78 mg/日で所要量の 3.9 倍であった．

#### ビオチン

Fig. 8 に示したように，ビオチンは 0.10 mg/日で所要量の 3.3 倍であった．

#### ビタミン C

Fig. 9 に示したように，ビタミン C は 190 mg/日で所要量の 1.9 倍であった．

#### D．考察

Table 4 に得られた結果をまとめた．ビタミン C の飽和量は，米国で行われた既報<sup>1)</sup>の値とほぼ同じで 190 mg/日であった．したがって，ビタミン C の飽和値は民族が異なっても同じであると思われる．ビタミン B<sub>12</sub> に関しては，測定上の問題で今回は飽和点を求めることができなかったので，今後検討したい．他の水溶性ビタミンの飽和点は，大雑把に言えば，第六次改定日本人の栄養所要量の 3 倍程度であった．これらの飽和点の摂取量を続けた場合に，生活習慣病と関係の深い代謝性疾患である糖尿病，循環器系の疾病，痛風などに関連する臨床指標との関係を今後明らかにし，今回得られた飽和点での水溶性ビタミンの摂取の継続が，生活習慣病のリスクファクター軽減となるか否かを検討したい．

#### E．健康危険情報

特記する情報はない．

#### F．研究発表

##### 1．論文発表

なし

##### 2．口頭発表

食事摂取基準公開講演会（平成 16 年 1 月 22 日，国立健康・栄養研究所）．

主催：日本栄養・食糧学会食事摂取基準検討委員会

#### G．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1．特許予定

なし

##### 2．実用新案登録

なし

##### 3．その他

なし

#### H．引用文献

1. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, park JB, Lazarev A, Graumlich JF, King J, Cantilena LR (1996) Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Sci USA* 93:3704-9.

Table 1. Characteristics of the Subjects.

Subjects	Age (Yr)	Height (cm)	Body weight (kg)	BMI
Female 1	21	161.0	50.0	19.29
Female 2	21	161.0	52.5	20.25
Female 3	21	162.0	46.0	17.53
Female 4	21	160.7	53.0	20.52
Female 5	21	160.5	53.0	20.57
Female 6	21	165.0	52.5	19.28
Mean	21.0	161.7	51.2	19.57
SEM	0.0	0.6	1.1	0.46

Table 2. The Composition of the Diet 1.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	402	689	617	1784
Protein (g)	19.5	23.8	25.2	68.6
Fat (g)	15.7	25.5	9.6	50.8
carbohydrates (g)	46.0	85.8	104.4	248.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	150	309	419	878
Vitamin D (μg)	1	0	2	3
Vitamin E (mg)	1.1	2.1	2.4	5.6
Vitamin K (μg)	8	204	98	311
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.17	0.07	0.59
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.20	0.25	0.92
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.36	0.68	1.24
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	0.7	0.5	6.2	7.4
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	7.04	8.42	14.89	30.35
Pantothenic acid (mg)	1.97	4.21	3.14	9.32
Folic acid (μg as pteroil monoglutamic acid)	52	134	44	230
Biotin (μg)	21	20	26	67
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	34	50	118
Minerals				
Na (mg)	794	1175	850	2845
K (mg)	592	601	625	1993
Ca (mg)	249	142	85	479
Mg (mg)	47	71	74	192
P (mg)	380	293	317	1071
Fe (mg)	0.8	3.4	2.6	6.7
Zn (mg)	1.8	3.7	2.5	8.0
Cu (mg)	0.15	0.44	0.43	1.02

<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, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<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.

Table 3. The Composition of the Diet 2.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	463	549	606	1693
Protein (g)	19.6	21.4	20.5	61.5
Fat (g)	22.3	12.8	10.0	45.0
carbohydrates (g)	46.1	85.6	105.5	249.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	294	144	444	882
Vitamin D (μg)	1	0	0	1
Vitamin E (mg)	2.7	0.6	2.9	6.2
Vitamin K (μg)	12	98	100	210
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.09	0.02	0.46
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.18	0.17	0.81
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.35	0.31	0.86
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	0.7	0.3	10.3	11.3
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	7.04	8.08	9.67	24.79
Pantothenic acid (mg)	1.97	3.73	3.55	9.25
Folic acid (μg as pteroil monoglutamic acid)	52	125	105	282
Biotin (μg)	21	12	20	53
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	25	53	112
Minerals				
Na (mg)	833	1237	1080	3177
K (mg)	594	851	615	2235
Ca (mg)	250	173	96	523
Mg (mg)	47	113	96	257
P (mg)	381	253	317	1032
Fe (mg)	0.8	6.2	3.2	10.2
Zn (mg)	1.9	2.8	4.2	8.9
Cu (mg)	0.15	0.33	0.47	0.95

<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, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<sup>2</sup>The niacin equivalent intake was calculates 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.

Table 4. A Comparison of the Values between the 6th Revised Japanese Recommended Dietary Allowances (RDA) and the Saturated Points obtained from the Present Data.

Vitamins	Japanese RDA (Female, 18-29 years old)	Saturated point	Saturated point/Japanese RDA
Vitamin B <sub>1</sub>	0.42 mg/1000 kcal	1.2 mg/1000 kcal	2.9
Vitamin B <sub>2</sub>	0.48 mg/1000 kcal	2.2 mg/1000 kcal	4.6
Vitamin B <sub>6</sub> *	0.017 mg/g protein	0.066 mg/g protein	3.7
Niacin	6.3 mg/1000 kcal	34.5 mg/1000 kcal	5.5
Pantothenic acid	5 mg/day	24 mg/day	4.8
Folic acid	0.2 mg/day	0.78 mg/day	3.9
Biotin	0.03 mg/day	0.10 mg/day	3.3
Vitamin C	100 mg/day	190 mg/day	1.9

\*Pyridoxine was given to the subjects, so the bioavailability of 0.75 was not considered (EAR = 0.014 mg/g protein. RDA = EAR (0.014))

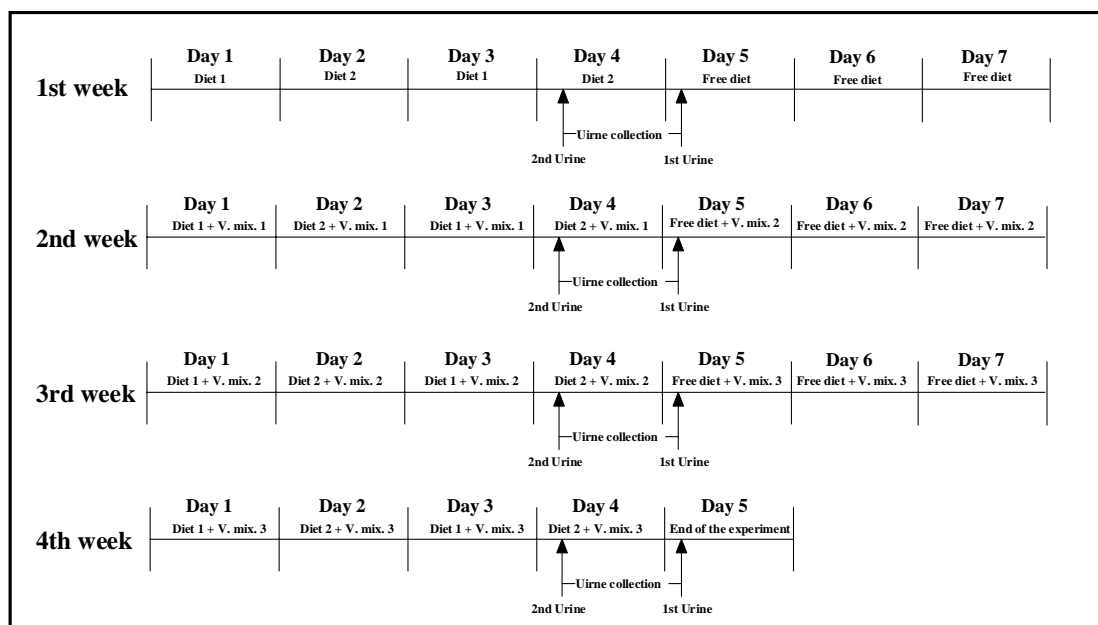


Fig. 1. The Scheme of the Study Design

The subjects were fed the diet shown in Tables 1 (diet 1) and 2 (diet 2) followed as in the Figure. The administration amount in each week was divided into 3:4:3 in breakfast:lunch:supper. Urine samples (around 07:00 on Day 4-07:00 on Day 5) were collected and the collected samples were immediately treated as shown in "Materials and Methods". After the urine collection had been finished, the subjects were taken free diet on Day 5-Day 7 on each week. "The vitamin mixtures 1 (The objected amount of each water-soluble vitamin was 1-fold for the respective RDA. The following values were chemically measured.)" contains 0.56 mg of thiamin, 0.92 mg of riboflavin, 0.96 mg of pyridoxine, 9.2 mg of nicotinamide, 4.77 mg of pantothenic acid, 0.205 mg of folic acid, 0.026 mg of biotin, and 98 mg of ascorbic acid. "The vitamin mixtures 2 (The objected amount of each water-soluble vitamin was 3-folds for the respective RDA. The following values were chemically measured.)" contains 1.78 mg of thiamin, 2.95 mg of riboflavin, 3.21 mg of pyridoxine, 36.4 mg of nicotinamide, 4.77 mg of pantothenic acid, 0.530 mg of folic acid, 0.084 mg of biotin, and 296 mg of ascorbic acid. "The vitamin mixtures 3 (The objected amount of each water-soluble vitamin was 6-folds for the respective RDA. The following values were chemically measured.)" contains 3.89 mg of thiamin, 5.74 mg of riboflavin, 6.61 mg of pyridoxine, 67.4 mg of nicotinamide, 4.77 mg of pantothenic acid, 1.34 mg of folic acid, 0.182 mg of biotin, and 600 mg of ascorbic acid.

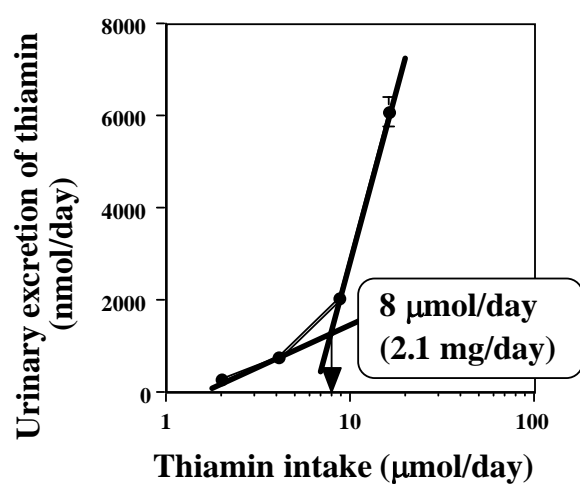


Fig. 2. The Relationships of Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin) Intakes and the Urinary Excretion of Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin).

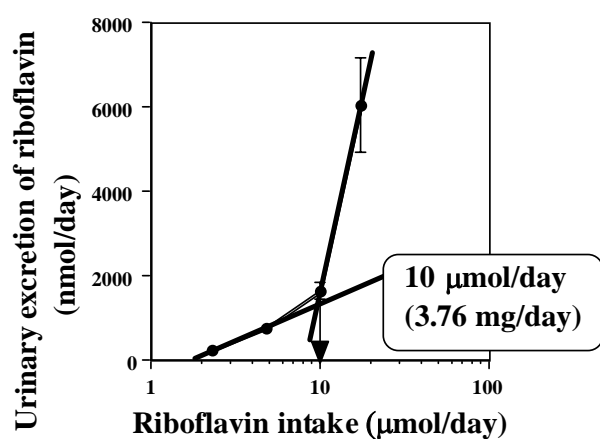


Fig. 3. The Relationships of Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin) Intakes and the Urinary Excretion of Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin).

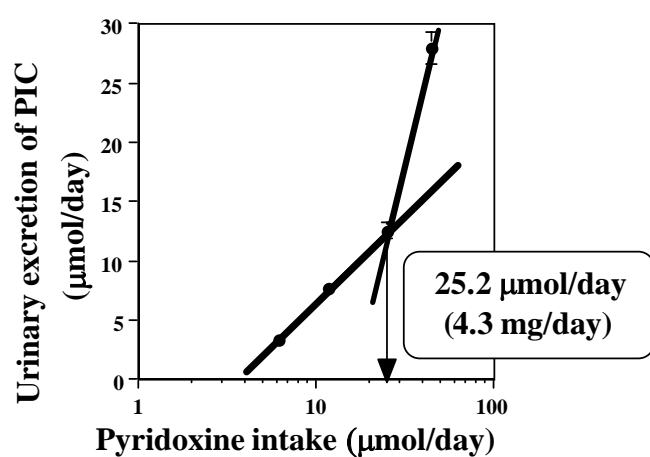


Fig. 4. The Relationships of Vitamin B<sub>6</sub> (Pyridoxine) Intakes and the Urinary Excretion of 4-Pyridoxic acid (Vitamin B6 catabolite).

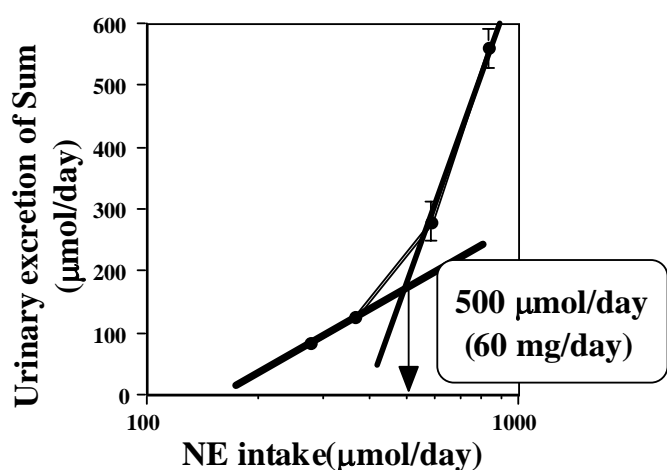


Fig. 5. The Relationships of Niacin-equivalent (Nicotinamide) Intakes and the Urinary Excretion of Sum of MNA, 2-Py and 4-Py (Nicotinamide catabolites).



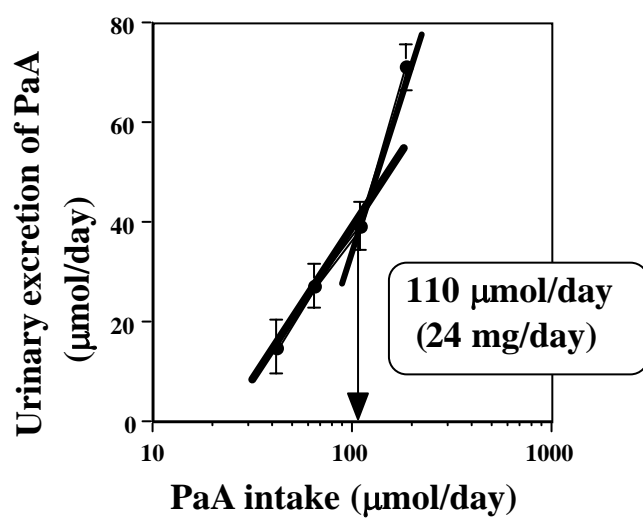


Fig. 6. The Relationships of Pantothenic Acid Intakes and the Urinary Excretion of Pantothenic Acid.

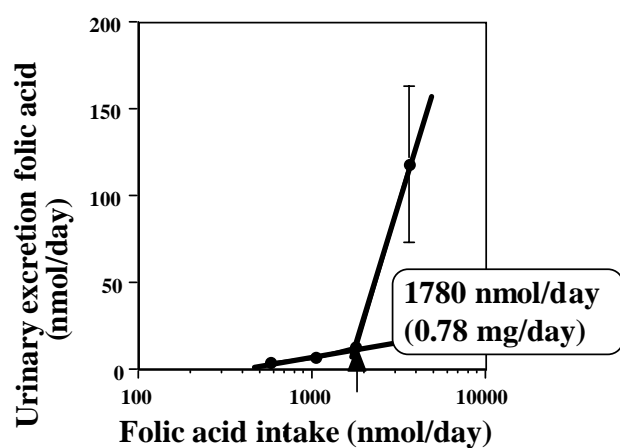


Fig. 7. The Relationships of Folic Acid Intakes and the Urinary Excretion of Folic Acid.

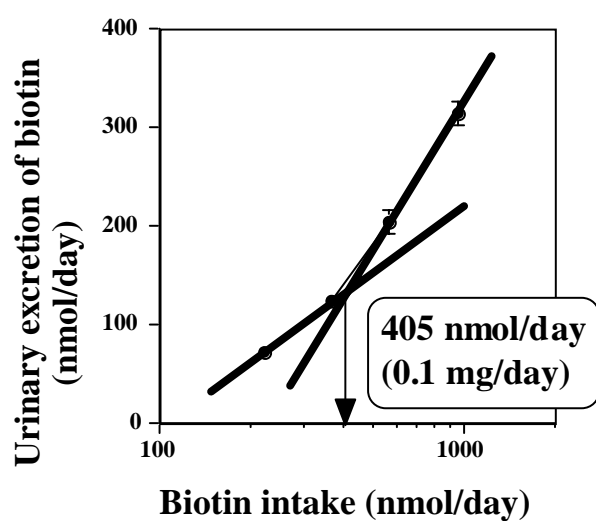


Fig. 8. The Relationships of Biotin Intakes and the Urinary Excretion of Biotin.

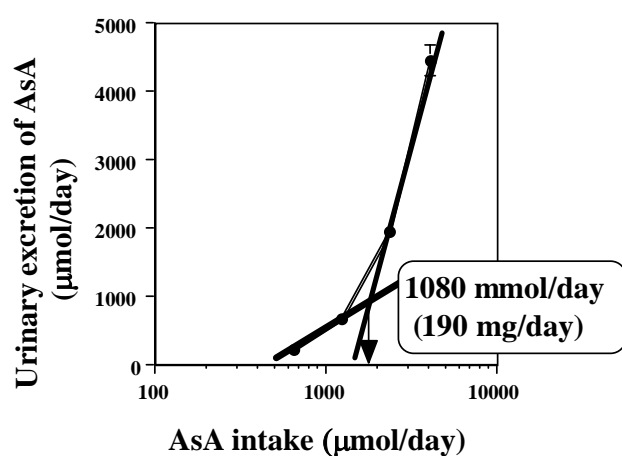


Fig. 9. The Relationships of Ascorbic Acid Intakes and the Urinary Excretion of Ascorbic Acid.

・ヒトを用いた水溶性ビタミン食事摂取基準の検討

3. 食品中のB群ビタミンの生物利用率の測定方法の開発

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

食品中のB群ビタミンの生物利用率を、ヒトを用いて測定する方法を構築した。実験期間は12日間である。栄養所要量に示された量の栄養素をほぼ含む規定食を4日間摂取させた（特にB群ビタミンには配慮した）。実験第4日の1日尿を採取し、B群ビタミンの分析を行い、データ1とした。実験第5日～7日は、被験者の負担を軽減させるために自由食を摂取させた。但し、次の実験データを得るために、栄養所要量に示された量のB群ビタミン混合を付加させた。第2週目の第1日から第4日は規定食+栄養所要量に示された量のB群ビタミン混合を摂取させた。実験4日の1日尿を採取し、B群ビタミンの分析を行い、データ2とした。生物利用率は次のように計算した。ビタミンB<sub>1</sub>を例に説明する。 $A = (\text{データ2のビタミンB}_1\text{値} - \text{データ1のビタミンB}_1\text{値}) / \text{B群ビタミン混合中のビタミンB}_1\text{量}$ 。 $B = (\text{データ1のビタミンB}_1\text{値}) / \text{食品中のビタミンB}_1\text{量}$ 。生物利用率(%) =  $(B / A) \times 100$  から計算した。女子学生が普段摂取している代表的な食事を基本とした規定食を作成して、生物利用率を調べた。その結果、ビタミンB<sub>1</sub>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。

A. 目的

食品中のビタミンの多くは、遊離型ではなく、いわゆる結合型と称される形で存在している。生細胞中のB群ビタミンは、酵素タンパク質の補酵素としてその活性中心に存在している。植物性食品では、ピリドキシン、ニコチン酸、パントテン酸のようにグルコースなどの糖と結合した形で存在しており、生物利用率の低いことが明らかとなっているものもある。従って、我々が食品中のB群ビタミンを吸収し、利用するには、まず結合型を遊離型にする消化という過程が必要である。この消化作用は、必ずしも完全ではない。従って、我々が、摂取したビタミンのうちの何%を吸収・利用できるのかをあらかじめ知っておくことにより、質の高い栄養を達成することができる。そのためには、食品中のビタミンの生物利用率を決めるための実用的な実験方法の開発が必要である。

B. 実験方法

被験者

女子学生を被験者とした。被験者の身体的特徴をTable 1に示した。

食事

2種類の食事を摂取させた。その栄養素成分はTable 2とTable 3に示した。ビタミンB<sub>12</sub>を除く7種類の水溶性ビタミンは実測値である。他は五訂日本食品標準成分表を用いて、計算した。

実験計画

概略をFig. 1に示した。

女子学生が選択する一般的な食事メニューを、第1週目は4日間摂取させ、実験開始4日の24時間尿を採取し、水溶性ビタミン量を測定した（Data 1）。5日目の採尿終了後～7日目は自由食とした。但し、食事に含まれる水溶性ビタミン量とほぼ当量の水溶性ビタミン混合を摂取させた。第2週目は、引き続き、一定の食事を与え、さらに、その食事に含まれる水溶性ビタミン量とほぼ同じ量の水溶性ビタミン量混合を摂取させた。第2週目の4日目の24時間尿を採取し、水溶性ビタミン量を測定した（Data 2）。蓄尿中の尿は氷中に保存し、24時間尿の採取後、直ちに容量を測定した。水溶性ビタミンは化学構造上の違いから、安定化条件が異なる。ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>、ビタミンB<sub>6</sub>、ナイアシンとその異化代謝産物測定のためには、尿9 mlに1 mol/L HClを添加した後、-20℃で保

存した。パントテン酸は尿をそのまま-20で保存した。

#### 分析方法

##### ビタミン B<sub>1</sub>

尿中のビタミン B<sub>1</sub> 定量方法に記した方法に従って行った。

##### ビタミン B<sub>2</sub>

尿中のビタミン B<sub>2</sub> 定量方法に記した方法に従って行った。

##### ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物 4-ピリドキシン酸

尿中の 4-ピリドキシン酸定量方法に記した方法に従って行った。

##### ナイアシンの異化代謝産物 MNA, 2-Py, 4-Py

尿中の MNA, 2-Py, 4-Py 定量方法に記した方法に従って行った。

##### パントテン酸

尿中のパントテン酸定量方法に記した方法に従って行った。

#### C. 結果

食事を摂取している時の B 群ビタミンの尿中排泄量を Data 1 として、食事にビタミン混合を付加した時の排泄量を Data 2 として Table 4 に示した。また、ビタミン混合付加による増大量を Data 3 として Table 4 に示した。生体利用率の計算は、食事の中のビタミンを 1 mg 摂取した時に尿中に排泄されるビタミン量と添加した合成ビタミンを 1 mg 摂取した時に増加したビタミン排泄量との比較から計算した。その結果を Table 5 に示した。

##### ビタミン B<sub>1</sub>

生体利用率は以下の計算によって求めた。  
A = Data 1 のビタミン B<sub>1</sub> 排泄量 (μmol/day)  
/ 食事の中のビタミン B<sub>1</sub> 摂取量の値 (mg/day)。  
B = Data 3 のビタミン B<sub>1</sub> 排泄量 (μmol/day)  
/ 合成ビタミン B<sub>1</sub> 付加量の値 (mg/day)。  
生体利用率は「A」/「B」×100 から求めた。その結果は、上述のように、平均値±SD で、67±20%であった。最小値は 42%、最高値は 87%であった。

##### ビタミン B<sub>2</sub>

生体利用率は、Table 5 に示したように 64±16%であった。最小値は 41%、最大値は 90%であった。

##### ビタミン B<sub>6</sub>

生体利用率は、Table 5 に示したように 73±5%であった。最小値は 66%、最大値は 80%であった。

##### ナイアシン

生体利用率は、Table 5 に示したように 67±19%であった。最小値は 35%、最大値

は 80%であった。

##### パントテン酸

生体利用率は、Table 5 に示したように 69±11%であった。最小値は 51%、最大値は 78%であった。

#### D. 考察

標準的な米国人の食事の中のビタミン B<sub>6</sub> の生体利用率は、相当する化学的合成品のビタミンの利用率の 75%程度、パントテン酸は 50%程度であることが報告されている (1)。ビタミン B<sub>12</sub> は、放射性ビタミン B<sub>12</sub> を投与したホール・ボディー・カウント法を用いて、経口投与した合成ビタミン B<sub>12</sub> の約 50%が吸収されたことが報告されている (2)。一方、標準的な日本食に関する報告はみあたらない。

今回、簡便で正確に食品中の水溶性ビタミンの生体利用率を求める方法を確立することができた。今回の実験では、女子学生が選択する典型的なメニューでの水溶性ビタミンの生体利用率を明らかにした。なお、今回明らかにできなかったビタミン B<sub>12</sub>、葉酸、ビオチン、ビタミン C に関しては、今後明らかにしたい。

今回確立した方法を駆使して、各年齢層が食している典型的なメニューを選択し、食品中の水溶性ビタミンの生体利用率を明らかにすれば、栄養資源としての数値が記載されている食品を知ることができる。

#### E. 健康危険情報

特記する情報はない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 口頭発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許予定

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### H. 引用文献

1. Tarr JB, Tamura T, Stokstad ELR (1981) Availability of vitamin B<sub>6</sub> and pantothenate in an average American diet in man. Am J Clin Nutr 34: 1328-37.
2. Heyssel RM, Bozian RC, Darby WJ, Bell MC (1966) Vitamin B<sub>12</sub> turnover in man. The assimilation of vitamin B<sub>12</sub> from natural

foodstuff by man and estimates of minimal daily requirements. Am J Clin Nutr 18: 176-84.

Table 1. Characteristics of the Subjects.

Subjects	Age (Yr)	Height (cm)	Body weight (kg)	BMI
Female 1	21	161.0	50.0	19.29
Female 2	21	161.0	52.5	20.25
Female 3	21	162.0	46.0	17.53
Female 4	21	160.7	53.0	20.52
Female 5	21	160.5	53.0	20.57
Female 6	21	165.0	52.5	19.28
Mean	21.0	161.7	51.2	19.57
SEM	0.0	0.6	1.1	0.46

Table 2. The Composition of the Diet 1.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	402	689	617	1784
Protein (g)	19.5	23.8	25.2	68.6
Fat (g)	15.7	25.5	9.6	50.8
Carbohydrates (g)	46.0	85.8	104.4	248.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	150	309	419	878
Vitamin D (μg)	1	0	2	3
Vitamin E (mg)	1.1	2.1	2.4	5.6
Vitamin K (μg)	8	204	98	311
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.17	0.07	0.59
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.20	0.25	0.92
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.36	0.68	1.24
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	0.7	0.5	6.2	7.4
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	7.04	8.42	14.89	30.35
Pantothenic acid (mg)	1.97	4.21	3.14	9.32
Folic acid (μg as pteroil monoglutamic acid)	52	134	44	230
Biotin (μg)	21	20	26	67
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	34	50	118
Minerals				
Na (mg)	794	1175	850	2845
K (mg)	592	601	625	1993
Ca (mg)	249	142	85	479
Mg (mg)	47	71	74	192
P (mg)	380	293	317	1071
Fe (mg)	0.8	3.4	2.6	6.7
Zn (mg)	1.8	3.7	2.5	8.0
Cu (mg)	0.15	0.44	0.43	1.02

<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, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<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.

Table 3. The Composition of the Diet 2.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	463	549	606	1693
Protein (g)	19.6	21.4	20.5	61.5
Fat (g)	22.3	12.8	10.0	45.0
Carbohydrates (g)	46.1	85.6	105.5	249.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	294	144	444	882
Vitamin D (μg)	1	0	0	1
Vitamin E (mg)	2.7	0.6	2.9	6.2
Vitamin K (μg)	12	98	100	210
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.09	0.02	0.46
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.18	0.17	0.81
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.35	0.31	0.86
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	0.7	0.3	10.3	11.3
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	7.04	8.08	9.67	24.79
Pantothenic acid (mg)	1.97	3.73	3.55	9.25
Folic acid (μg as pteroil monoglutamic acid)	52	125	105	282
Biotin (μg)	21	12	20	53
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	25	53	112
Minerals				
Na (mg)	833	1237	1080	3177
K (mg)	594	851	615	2235
Ca (mg)	250	173	96	523
Mg (mg)	47	113	96	257
P (mg)	381	253	317	1032
Fe (mg)	0.8	6.2	3.2	10.2
Zn (mg)	1.9	2.8	4.2	8.9
Cu (mg)	0.15	0.33	0.47	0.95

<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, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<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.

Table 4. The Comparison of the Values between Urinary Excretions of Vitamins when the subjects are fed on a diet only and when on a diet and vitamin mixtures.

Vitamins	Urinary excretion of Vitamins ( $\mu\text{mol/day}$ ) Data 1	Urinary excretion of Vitamins ( $\mu\text{mol/day}$ ) Data 2	Urinary excretion of Vitamins ( $\mu\text{mol/day}$ ) Data 3
Thiamin	$0.288 \pm 0.074$	$0.780 \pm 0.176$	$0.492 \pm 0.149$
Riboflavin	$0.283 \pm 0.072$	$0.758 \pm 0.165$	$0.475 \pm 0.115$
Pyridoxine	$3.435 \pm 0.409$	$7.750 \pm 0.652$	$4.315 \pm 0.256$
Nicotinamide	$85.617 \pm 10.848$	$131.612 \pm 16.568$	$45.995 \pm 15.202$
Pantothenic acid	$14.555 \pm 1.982$	$25.742 \pm 4.848$	$11.187 \pm 3.149$

Vitamins	Dietary vitamin intake (mg/day)	Added synthesized vitamin intake (mg/day)	
Thiamin	0.52	0.56	-
Riboflavin	0.87	0.92	-
Pyridoxine	1.05	0.96	-
Nicotinamide	27.6	9.2	-
Pantothenic acid	9.30	4.79	-

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 "Data 2" - "Data 1".

Values are means  $\pm$  SD for 6 subjects.



Table 5. Bioavailability of B-Vitamins in some foods.

Vitamins	Urinary excretion/mg vitamin intake* ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ dietary vitamin intake)	Increased urinary excretion/mg vitamin intake** ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ added synthesized vitamin intake)	Bioavailability (%)
Thiamin	$0.554 \pm 0.142$	$0.879 \pm 0.267$	$67 \pm 20$
Riboflavin	$0.326 \pm 0.083$	$0.516 \pm 0.125$	$64 \pm 16$
Pyridoxine	$3.271 \pm 0.389$	$4.495 \pm 0.267$	$72 \pm 5$
Nicotinamide	$3.102 \pm 0.393$	$4.998 \pm 1.652$	$67 \pm 19$
Pantothenic acid	$1.565 \pm 0.213$	$2.335 \pm 0.657$	$69 \pm 11$

\*The values are calculated as follows: Data 1 ( $\mu\text{mol}/\text{day}$ )/dietary vitamin intake (mg/day).

\*\*The values are calculated as follows: Data 3 ( $\mu\text{mol}/\text{day}$ )/added synthesized vitamin intake (mg/day).

Values are means  $\pm$  SD for 6 subjects.

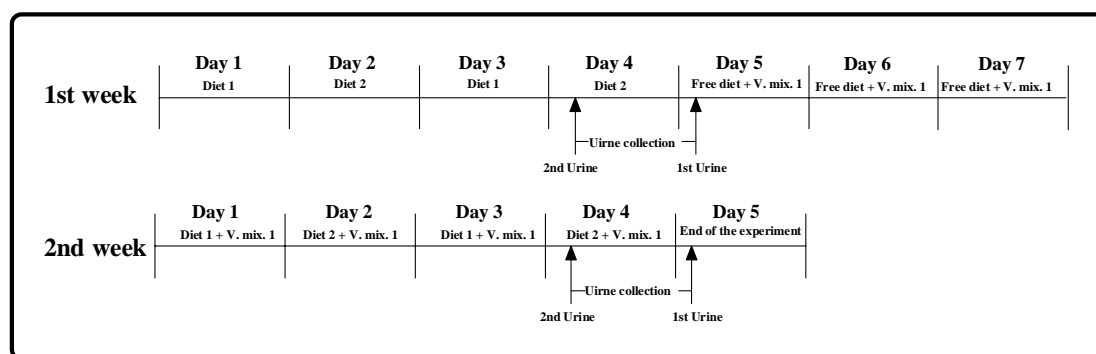


Fig. 1. Study Design

平成16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

・ヒトを用いた水溶性ビタミン食事摂取基準の検討

#### 4. ニコチンアミドの添加は *de novo* ニコチンアミド生合成経路に影響を及ぼさない（ヒト）

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

##### 研究要旨

ニコチンアミドは、ヒトにおいてもトリプトファンから *de novo* 合成される。トリプトファン-ナイアシン転換係数を 60 とすると、日本人では、ナイアシン当量摂取量の半分はトリプトファンから生合成されたものであるため、この係数をどのように扱うかは、ナイアシンの必要量算定においてきわめて重要な問題となっている。ところが、この *de novo* ニコチンアミド合成経路が、ヒトにおいて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、未だに報告がない。もし、摂取ニコチンアミド量によって *de novo* ニコチンアミド生合成経路がフィードバック阻害をうけているならば、ナイアシンの必要量の策定に大きな影響を及ぼすことになる。そこで、6名の女性を被験者として、ニコチンアミドの付加が *de novo* ニコチンアミド生合成経路の中間代謝産物の産生に及ぼす影響を調べた。その結果、アンスラニル酸、キヌレン酸、キサントレン酸、3-ヒドロキシキヌレン酸、キノリン酸の産生量はニコチンアミドを 89 $\mu$ mol/日、310 $\mu$ mol/日、562 $\mu$ mol/日という量を付加させても、全く変動しなかった。すなわち、*de novo* ニコチンアミド生合成経路は目的産物であるニコチンアミドによってフィードバック阻害を受けていないことが明らかとなった。したがって、ナイアシンの必要量を算定する上で、摂取ニコチンアミド量を考慮に入れたトリプトファン-ナイアシン係数を算定する必要がないことが、はじめて明らかとなった。

## A. 目的

生合成経路の一般的な調節機構の1つに最終産物によるフィードバック阻害がある。例えば、de novo コレステロール生合成経路は最終産物のコレステロールがその中間酵素であるHMG-CoA還元酵素をフィードバック阻害することで、体内のコレステロール含量が調節されている<sup>1)</sup>。つまり、食事から摂取するコレステロール量が増大すると、de novo コレステロール生合成経路活性は低下する。

ビタミンは体内では生合成されないことが定義の1つとされるが、B群ビタミンの1つであるニコチンアミドは必須アミノ酸のトリプトファンから生合成されている。ヒトでは、60 mgのトリプトファンから1 mgのニコチンアミドが生合成されているものとして、ナイアシンの所要量が策定されている<sup>2)</sup>。しかし、このトリプトファン-ニコチンアミド転換率が、摂取したニコチンアミド量によって、フィードバック阻害を受けるか否かは未だに不明である。そこで、ニコチンアミド摂取量によってde novo ニコチンアミド生合成経路活性がどのように変動するのかをヒトを被験者として調べた。

## B. 実験方法

### 被験者

女子学生を被験者とした。被験者の身体的特徴をTable 1に示した。

### 食事

2種類の食事を摂取させた。その栄養素成分はTable 2とTable 3に示した。ビタミンB<sub>12</sub>を除く7種類の水溶性ビタミンは実測値である。他は五訂日本食品標準成分表を用いて、計算した。

### 実験計画

概略をFig. 1に示した。実験期間は4週間であり、各週ともに、Day 1~Day 4はTables 2と3に示した食事を与え、Day 5~Day 7は被験者の負担を軽減するために自由食を摂らせた。但し、ビタミンを含む食品の摂取は控えさせた。

第1週のDay 1~Day 4はTables 2と3に示した食事のみを与えた。Day 4の尿を採取した。その後、すなわちDay 5の朝食から1日当たり89  $\mu\text{mol}$  (約11 mg)のニコチンアミドを含む水溶性ビタミン混合を与えた。

第2週のDay 1~Day 4はTables 2と3に示した食事と1日当たり89  $\mu\text{mol}$  (約11 mg)のニコチンアミドを含む水溶性ビタミン混合を与えた。Day 4の尿を採取した。その後、

すなわちDay 5の朝食から1日当たり310  $\mu\text{mol}$  (約38 mg)のニコチンアミドを含む水溶性ビタミン混合を与えた。

第3週のDay 1~Day 4はTables 2と3に示した食事と1日当たり310  $\mu\text{mol}$  (約38 mg)のニコチンアミドを含む水溶性ビタミン混合を与えた。Day 4の尿を採取した。その後、すなわちDay 5の朝食から1日当たり562  $\mu\text{mol}$  (約69 mg)のニコチンアミドを含む水溶性ビタミン混合を与えた。

第4週のDay 1~Day 4はTables 2と3に示した食事と1日当たり562  $\mu\text{mol}$  (約69 mg)のニコチンアミドを含む水溶性ビタミン混合を与えた。Day 4の尿を採取した。

なお、服用させたニコチンアミドを含む水溶性ビタミン混合は朝食:昼食:夕食=3:4:3の割合で、食後すぐに摂取させた。

蓄尿中の尿は氷中に保存し、24時間尿の採取後、直ちに容量を測定した。トリプトファン-ニコチンアミド代謝産物を安定化させるために、9 mlの尿に1 mol/LのHClを加えた後、-20℃で使用するまで保存した。

### 分析方法

#### アンスラニル酸の定量

アンスラニル酸の定量方法に記載した方法に従った。

#### キヌレン酸の定量

キヌレン酸の定量方法に記載した方法に従った。

#### キサントレン酸の定量

キサントレン酸の定量方法に記載した方法に従った。

#### 3-ヒドロキシアンスラニル酸の定量

3-ヒドロキシアンスラニル酸の定量方法に記載した方法に従った。

#### キノリン酸の定量

キノリン酸の定量方法に記載した方法に従った。

#### MNAの定量

MNA (*N*<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド)の定量方法に記載した方法に従った。

ニコチンアミド、2-Py、及び4-Pyの同時定量  
ニコチンアミド、2-Py (*N*<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド)、及び4-Py (*N*<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド)の定量方法に記載した方法に従った。

## C. 結果

### 摂取ニコチンアミド量と尿中ニコチンアミド及びその異化代謝産物合計排泄量との関係

Fig. 2に示したように、摂取したニコチン

アミド量に応じて、尿中ニコチンアミド及びその異化代謝産物合計排泄量は増大した。つまり、摂取したニコチンアミドが体内に吸収されて、余剰のニコチンアミドが異化代謝されていることを意味している。

#### 摂取ニコチンアミド量と de novo ニコチンアミド生合成経路の上流中間代謝産物排泄量との関係

de novo ニコチンアミド生合成経路の中間代謝産物は、尿中に排泄される。出発物質は必須アミノ酸のトリプトファンである。摂取ニコチンアミドによってこの経路がどのような影響を受けているかを調べるには、中間代謝産物量を測定すればよい。その結果は Fig. 3 に示したように、アンスラニル酸、キヌレン酸、3-ヒドロキシアンスラニル酸、キノリン酸、すべて摂取したニコチンアミド量によって変動しなかった。これらの結果は、de novo ニコチンアミド生合成経路は最終代謝産物であるニコチンアミドによってフィードバック阻害を受けていないことが初めて明らかとなった。したがって、トリプトファン-ニコチンアミド転換効率には、ニコチンアミド摂取量とは関係がないことが明らかとなった。言い換えれば、ニコチンアミド摂取量がいくら多くても、de novo ニコチンアミド生合成経路が阻害されることはなく、全く独自に作動していることを意味している。

#### D. 考察

トリプトファン-ナイアシン転換経路は多くの栄養因子によって変動することが明らかにされている<sup>1)</sup>。しかしながら、最終産物のニコチンアミドによって de novo ニコチンアミド合成経路がどのような影響を受けるか否かに関しては不明のままであった。今回の実験で、この de novo 経路は摂取ニコチン

アミド量によって全く影響を受けないことがはじめて明らかとなった。つまり、トリプトファン-ナイアシン転換効率に関しては、第六次改定日本人の栄養所要量では、60 mg のトリプトファンが 1 mg のナイアシンに相当するという数値が採用されているが、この値をニコチンアミドの摂取量に応じて変動させる必要がないことを意味している。コレステロール生合成系とは異なり、最終産物によって制御されていないことは、必要量を定めるという作業においては、きわめて好都合な結果であった。

ナイアシンそのものの生理作用はない。活性型は補酵素型の NAD である。NAD の細胞内濃度の制御機構はきちりしていることは、柴田がすでに報告している。

#### E. 健康危険情報

特記する情報はない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 口頭発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許予定

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### H. 引用文献

1. 柴田克己, トリプトファン-ナイアシン転換立に及ぼすタンパク質・アミノ酸・脂質・糖質の影響. ビタミン, 70, 369-382 (1996).

Table 1. Characteristics of the Subjects.

Subjects	Age (Yr)	Height (cm)	Body weight (kg)	BMI
Woman 1	21	161.0	50.0	19.29
Woman 2	21	161.0	52.5	20.25
Woman 3	21	162.0	46.0	17.53
Woman 4	21	160.7	53.0	20.52
Woman 5	21	160.5	53.0	20.57
Woman 6	21	165.0	52.5	19.28
Mean	21.00	161.7	51.17	19.57
SD	0.00	1.7	2.80	1.16

Table 2. The Composition of the Diet 1.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	402	689	617	1784
Protein (g)	19.5	23.8	25.2	68.6
Fat (g)	15.7	25.5	9.6	50.8
carbohydrates (g)	46.0	85.8	104.4	248.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	150	309	419	878
Vitamin D (μg)	1	0	2	3
Vitamin E (mg)	1.1	2.1	2.4	5.6
Vitamin K (μg)	8	204	98	311
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.17	0.07	0.59
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.20	0.25	0.92
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.36	0.68	1.24
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	0.7	0.5	6.2	7.4
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	3.45	8.42	18.48	30.35
Pantothenic acid (mg)	1.97	4.21	3.14	9.32
Folic acid (μg as pteroil monoglutamic acid)	52	134	44	230
Biotin (μg)				
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	34	50	118
Minerals				
Na (mg)	794	1175	850	2845
K (mg)	592	601	625	1993
Ca (mg)	249	142	85	479
Mg (mg)	47	71	74	192
P (mg)	380	293	317	1071
Fe (mg)	0.8	3.4	2.6	6.7
Zn (mg)	1.8	3.7	2.5	8.0
Cu (mg)	0.15	0.44	0.43	1.02

<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, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<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.

Table 3. The Composition of the Diet 2.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	463	549	606	1693
Protein (g)	19.6	21.4	20.5	61.5
Fat (g)	22.3	12.8	10.0	45.0
carbohydrates (g)	46.1	85.6	105.5	249.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	294	144	444	882
Vitamin D (μg)	1	0	0	1
Vitamin E (mg)	2.7	0.6	2.9	6.2
Vitamin K (μg)	12	98	100	210
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.09	0.02	0.46
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.18	0.17	0.81
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.35	0.31	0.86
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	0.7	0.3	10.3	11.3
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	7.04	8.08	9.67	24.79
Pantothenic acid (mg)	1.97	3.73	3.55	9.25
Folic acid (μg as pteroil monoglutamic acid)	52	125	105	282
Biotin (μg)				
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	25	53	112
Minerals				
Na (mg)	833	1237	1080	3177
K (mg)	594	851	615	2235
Ca (mg)	250	173	96	523
Mg (mg)	47	113	96	257
P (mg)	381	253	317	1032
Fe (mg)	0.8	6.2	3.2	10.2
Zn (mg)	1.9	2.8	4.2	8.9
Cu (mg)	0.15	0.33	0.47	0.95

<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, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<sup>2</sup>The niacin equivalent intake was calculates 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.

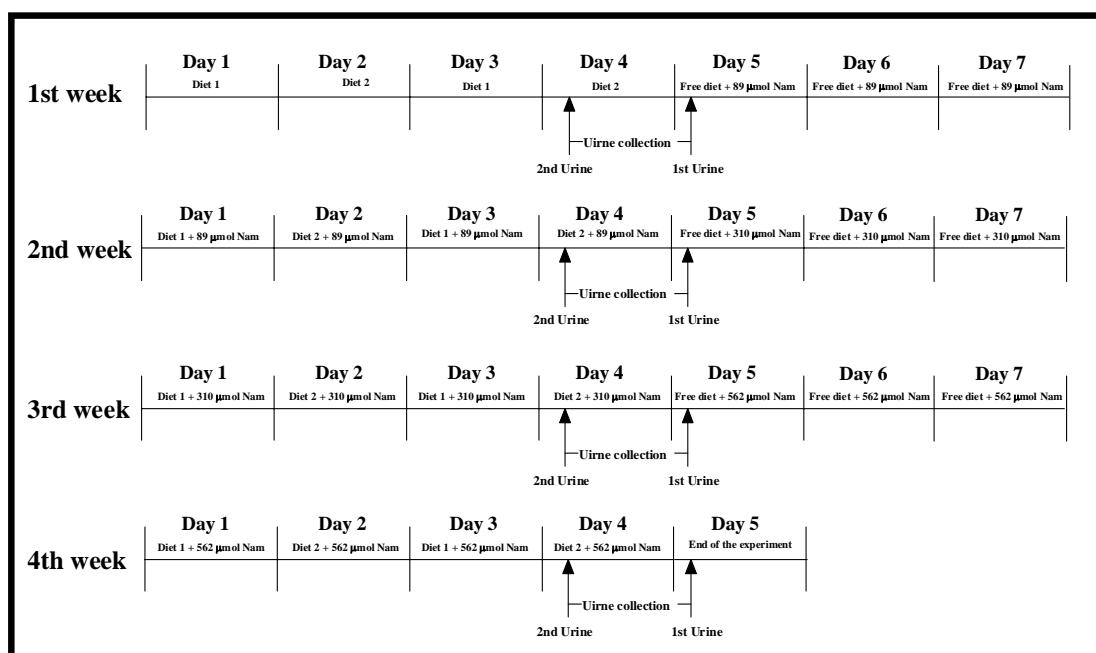


Fig. 1. The Scheme of the Experimental Design

The subjects were fed the diet shown in Tables 1 (diet 1) and 2 (diet 2) followed as in the Figure. The administration amount in each week was divided into 3:4:3 in breakfast:lunch:supper. Urine samples (around 07:00 on Day 4-07:00 on Day 5) were collected and the collected samples were immediately treated into an acidic condition (the final HCl concentration of 0.1 mol/L), and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until needed.

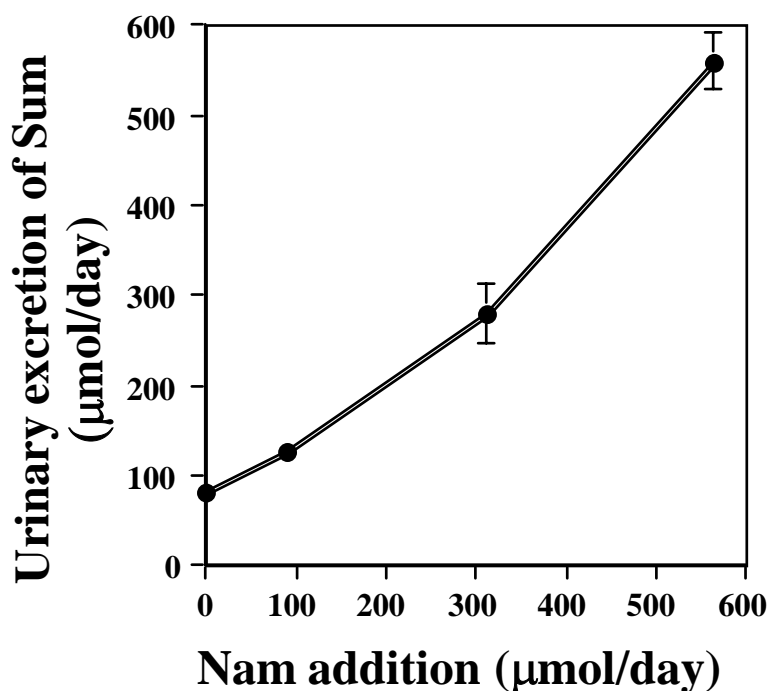


Fig. 2. Effect of the Administration of Nicotinamide on the Urinary Excretion of Sum (MNA + 2-Py + 4-Py).

The experimental conditions, see Fig. 1 and "Materials and Methods".



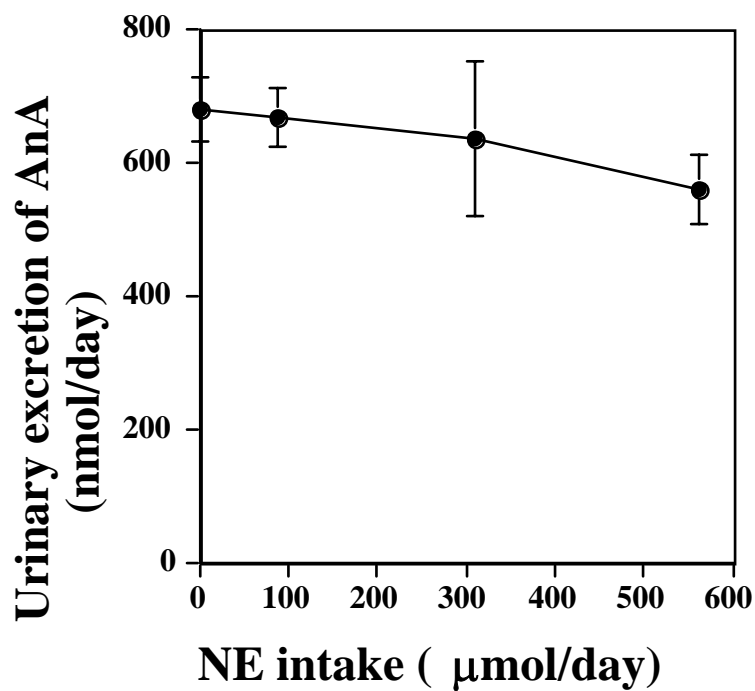


Fig. 3. Effect of the Administration of Nicotinamide on the Urinary Excretion of Anthranilic Acid. The experimental conditions, see Fig. 1 and "Materials and Methods".

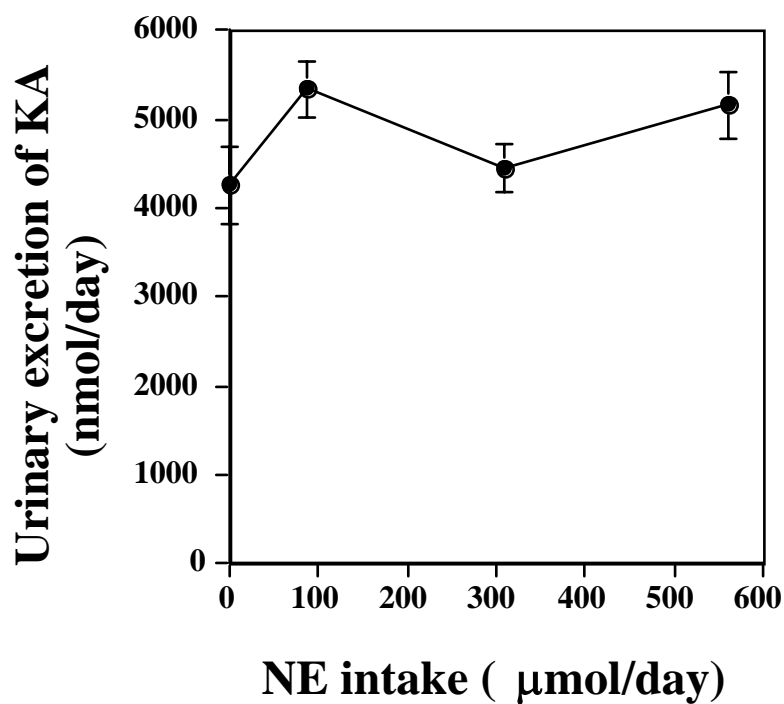


Fig. 4. Effect of the Administration of Nicotinamide on the Urinary Excretion of Kynurenic Acid (KA). The experimental conditions, see Fig. 1 and "Materials and Methods".

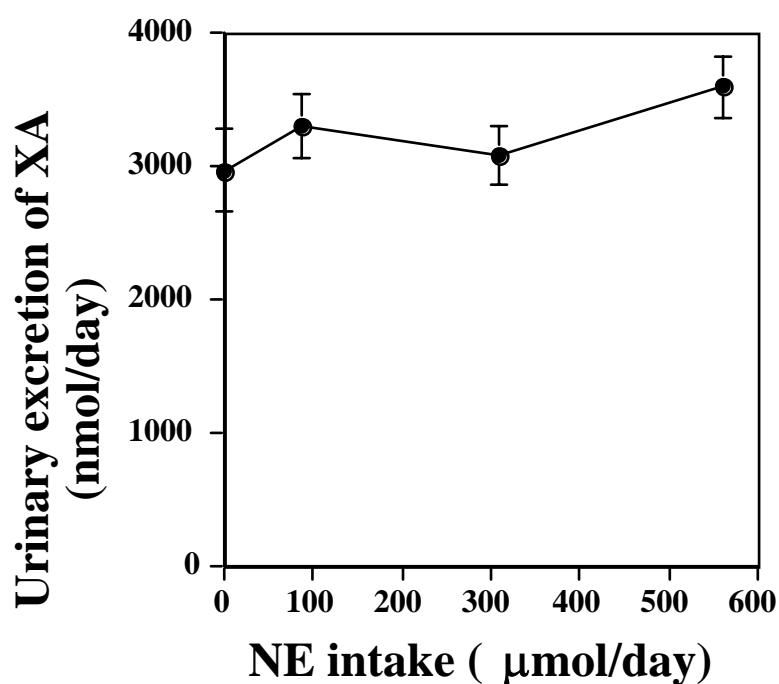


Fig. 5. Effect of the Administration of Nicotinamide on the Urinary Excretion of Xanthurenic Acid (XA).  
The experimental conditions, see Fig. 1 and "Materials and Methods".

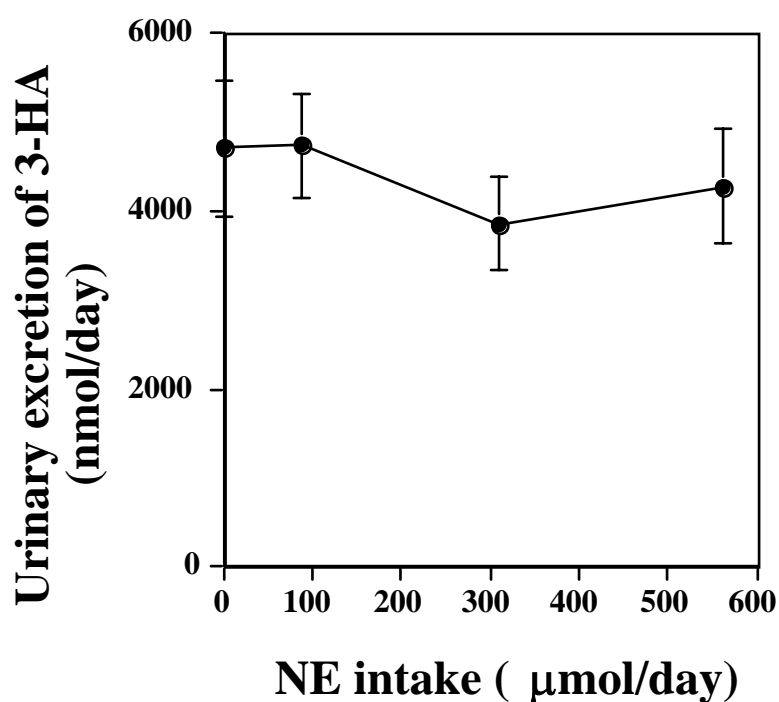


Fig. 6. Effect of the Administration of Nicotinamide on the Urinary Excretion of 3-Hydroxyanthranilic Acid (3-HA).  
The experimental conditions, see Fig. 1 and "Materials and Methods".

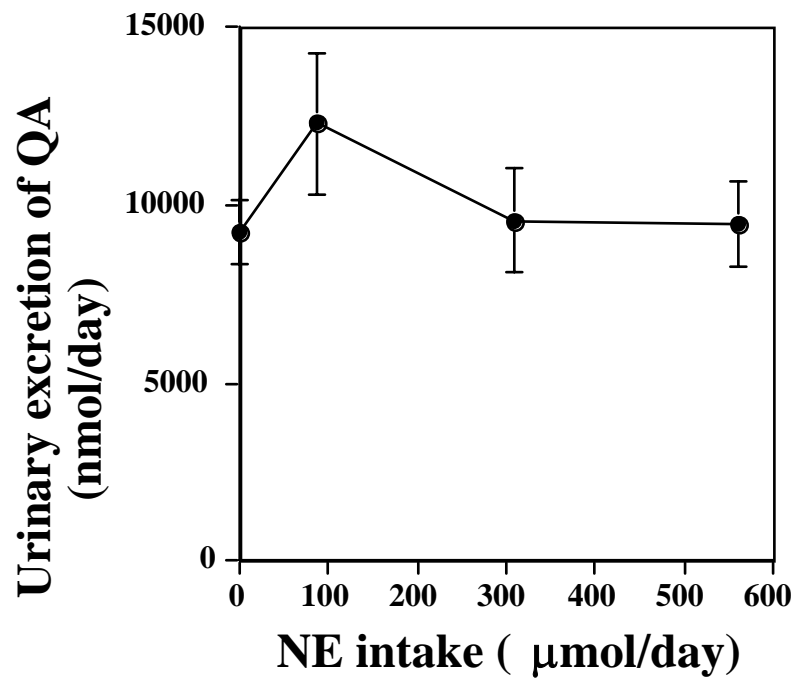


Fig. 7. Effect of the Administration of Nicotinamide on the Urinary Excretion of Quinolinic Acid (QA). The experimental conditions, see Fig. 1 and "Materials and Methods".

・ヒトを用いた水溶性ビタミン食事摂取基準の検討

5. 水溶性ビタミンの大量摂取1週間後の尿中水溶性ビタミン排泄量

－水溶性ビタミンのクリアランスの比較－

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

ビタミンの機能が新たに注目されてきた。このことが、きっかけとなり、所要量を超えた各種ビタミンを摂取するヒトが増えてきた。水溶性ビタミンといっても、化学構造上の共通性はなく、大量に摂取した後のクリアランスも異なることが予想されるが、未だに明確な報告はない。そこで、ヒトを使用して水溶性ビタミン類のクリアランスを比較してみた。通常食摂取時の第1週の4日の尿を採取・測定し、対照値とした。第2週は通常食＋第六次改定日本人の栄養所要量－食事摂取基準－に示された量の6倍量の水溶性ビタミン混合を1週間投与した。第2週の4日の尿を採取・測定した。第3週は、クリアランスを知るために、第1週と同じ食事を摂取させ、4日の尿を採取・測定した。その結果、ナイアシンとピオチンの各排泄量は1週間で完全に対照値まで戻っていた。しかしながら、ビタミンB<sub>1</sub>は対照値の10倍、ビタミンB<sub>2</sub>は3.3倍、ビタミンB<sub>6</sub>は2.0倍、パントテン酸は2.2倍、葉酸は2.3倍、ビタミンCは1.9倍であった。

A. 目的

ある種の疾病がビタミン欠乏に起因することが20世紀初頭から半世紀をかけて明らかにされてきた。20世紀の後半は、ビタミン欠乏症を予防するにはどの程度のビタミン摂取が必要であるかが明らかにされた。20世紀末には、ビタミンCに欠乏症である壊血病を予防する生理機能だけではなく、新たに抗酸化作用と疾病予防が期待できることが明らかにされ、ビタミンの機能が新たに注目されてきた。このことが、きっかけとなり、所要量を超えた各種ビタミンを摂取するヒトが増えてきた。水溶性ビタミンといっても、化学構造上の共通性はなく、大量に摂取した後のクリアランスも異なることが予想されるが、未だに明確な報告はない。そこで、ヒトを使用して水溶性ビタミン類のクリアランスを比較してみた。

B. 実験方法

被験者

女子学生を被験者とした。被験者の身体的特徴をTable 1に示した。

食事

2種類の食事を摂取させた。その栄養素成分はTable 2とTable 3に示した。ビタミン

B<sub>12</sub>を除く7種類の水溶性ビタミンは実測値である。他は五訂日本食品標準成分表を用いて、計算した。

実験計画

概略をFig. 1に示した。

通常食摂取時の第1週のDay 4の尿を採取・測定し、対照値とした。Day 5～Day 7は自由食としたが、第六次改定日本人の栄養所要量－食事摂取基準－に示された量の6倍量の水溶性ビタミン混合を投与した。第2週のDay 1～Day 4は通常食＋第六次改定日本人の栄養所要量－食事摂取基準－に示された量の6倍量の水溶性ビタミン混合を投与した。第2週のDay 4の尿を採取・測定した。Day 5～Day 7は自由食を摂取させた。但し、ビタミン混合の付加はしなかった。第3週は、クリアランスを知るために、第1週と同じ食事を摂取させ、Day 4の尿を採取・測定した。Day 5の第1回目の尿（午前7時頃）を採取後、実験を終了させた。

蓄尿中の尿は氷中に保存し、24時間尿の採取後、直ちに容量を測定した。水溶性ビタミンは化学構造上の違いから、安定化条件が異なる。ビタミンB<sub>1</sub>とナイアシンとその異化代謝産物測定のためには、尿9 mlに1 mol/L HClを添加した後、-20℃で保存した。ビタ

ミン B<sub>2</sub> は 尿 4.9 ml に氷酢酸 0.1 ml を加え、褐色瓶にて -20 で保存した。ビタミン C は、尿 5 ml に 10% メタリン酸 5 ml を加え、-20 で保存した。ビタミン B<sub>6</sub>、パントテン酸、葉酸、ビオチンは、尿をそのまま -20 で保存した。ビタミン B<sub>12</sub> は褐色瓶に、尿をそのままいれて -20 で保存した。

#### 分析方法

##### ビタミン B<sub>1</sub>

尿中のビタミン B<sub>1</sub> 定量方法に記した方法に従って行った。

##### ビタミン B<sub>2</sub>

尿中のビタミン B<sub>2</sub> 定量方法に記した方法に従って行った。

##### ビタミン B<sub>6</sub> の異化代謝産物 4-ピリドキシン酸

尿中の 4-ピリドキシン酸定量方法に記した方法に従って行った。

##### ナイアシンの異化代謝産物 MNA, 2-Py, 4-Py

尿中の MNA, 2-Py, 4-Py 定量方法に記した方法に従って行った。

##### パントテン酸

尿中のパントテン酸定量方法に記した方法に従って行った。

##### 葉酸

尿中の葉酸定量方法に記した方法に従って行った。

##### ビオチン

尿中のビオチン定量方法に記した方法に従って行った。

##### ビタミン C

尿中のビタミン C 定量方法に記した方法に従って行った。

#### C. 結果

その結果、ナイアシンとビオチンの各排泄量は 1 週間で完全に対照値まで戻っていた。しかしながら、ビタミン B<sub>1</sub> は対照値の 10 倍、ビタミン B<sub>2</sub> は 3.3 倍、ビタミン B<sub>6</sub> は 2.0 倍、パントテン酸は 2.2 倍、葉酸は 2.3 倍、ビタミン C は 1.9 倍であった。

#### D. 考察

「水溶性ビタミンは大量に摂取しても、すぐに尿中にでてしまうので、過剰害はでな

い」というウワサがある。そこで、第 1 週目は規定食のみを食べてもらい、その時の尿に排泄されるビタミン量を分析し、その時の値を基準値とした。第 2 週目は所要量の 6 倍量の水溶性ビタミン混合を規定食に付加させた尿を集め分析を行った。そして、クリアランスを調べるために、ビタミン混合の付加を中止した時の尿を集め分析を行った。その結果は、完全に投与前に戻っていたビタミンは、ニコチンアミド、ビオチンの二つのビタミンのみであった。チアミン、リボフラビン、ピリドキシン、パントテン酸は投与前の値に戻りにくいビタミンであることが判明した。葉酸とアスコルビン酸はほぼ投与前の値に戻っていた。これらの差異が何に起因するのか、ヒトを被験者とした実験では明らかにすることはできない。動物実験を利用して明らかにしてみたい。クリアランスが遅かったビタミンには特別な貯蔵形態があるのか否か、特にパントテン酸のクリアランスが遅かったことは、パントテン酸欠乏が出現しにくい<sup>1)</sup> ことと関係があるかもしれない。

#### E. 健康危険情報

特記する情報はない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 口頭発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許予定

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### H. 引用文献

1. Fry PC, Fox HM, Tao HG (1976) Metabolic response to a pantothenic acid deficient diet in humans. J Nutr Sci Vitaminol 22: 339-46.

Table 1. Characteristics of the Subjects.

Subjects	Age (Yr)	Height (cm)	Body weight (kg)	BMI
Female 1	21	161.0	50.0	19.29
Female 2	21	161.0	52.5	20.25
Female 3	21	162.0	46.0	17.53
Female 4	28	168.0	55.0	19.49
Female 5	22	154.0	48.0	20.24
Female 6	21	160.5	53.0	20.57
Female 7	21	165.0	52.5	19.28
Mean	22.14	161.3	51.0	19.52
SD	2.61	4.3	3.2	1.02

Table 2. The Composition of the Diet 1.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	402	689	617	1784
Protein (g)	19.5	23.8	25.2	68.6
Fat (g)	15.7	25.5	9.6	50.8
carbohydrates (g)	46.0	85.8	104.4	248.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	150	309	419	878
Vitamin D (μg)	1	0	2	3
Vitamin E (mg)	1.1	2.1	2.4	5.6
Vitamin K (μg)	8	204	98	311
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.17	0.07	0.59
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.20	0.25	0.92
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.36	0.68	1.24
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	0.7	0.5	6.2	7.4
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	7.04	8.42	14.89	30.35
Pantothenic acid (mg)	1.97	4.21	3.14	9.32
Folic acid (μg as pteroil monoglutamic acid)	52	134	44	230
Biotin (μg)	21	20	26	67
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	34	50	118
Minerals				
Na (mg)	794	1175	850	2845
K (mg)	592	601	625	1993
Ca (mg)	249	142	85	479
Mg (mg)	47	71	74	192
P (mg)	380	293	317	1071
Fe (mg)	0.8	3.4	2.6	6.7
Zn (mg)	1.8	3.7	2.5	8.0
Cu (mg)	0.15	0.44	0.43	1.02

<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, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<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.

Table 3. The Composition of the Diet 2.

	Breakfast	Lunch	Dinner	Total
Energy (kcal)	463	549	606	1693
Protein (g)	19.6	21.4	20.5	61.5
Fat (g)	22.3	12.8	10.0	45.0
carbohydrates (g)	46.1	85.6	105.5	249.8
Fat-soluble vitamins				
Vitamin A (μg)	294	144	444	882
Vitamin D (μg)	1	0	0	1
Vitamin E (mg)	2.7	0.6	2.9	6.2
Vitamin K (μg)	12	98	100	210
Water-soluble vitamins <sup>1</sup>				
Vitamin B <sub>1</sub> (mg as thiamin)	0.35	0.09	0.02	0.46
Vitamin B <sub>2</sub> (mg as riboflavin)	0.47	0.18	0.17	0.81
Vitamin B <sub>6</sub> (mg as pyridoxine)	0.20	0.35	0.31	0.86
Vitamin B <sub>12</sub> (μg as cyanocobalamin)	0.7	0.3	10.3	11.3
Niacin equivalent <sup>2</sup> (mg)	7.04	8.08	9.67	24.79
Pantothenic acid (mg)	1.97	3.73	3.55	9.25
Folic acid (μg as pteroil monoglutamic acid)	52	125	105	282
Biotin (μg)	21	12	20	53
Vitamin C (mg as L-ascorbic acid)	34	25	53	112
Minerals				
Na (mg)	833	1237	1080	3177
K (mg)	594	851	615	2235
Ca (mg)	250	173	96	523
Mg (mg)	47	113	96	257
P (mg)	381	253	317	1032
Fe (mg)	0.8	6.2	3.2	10.2
Zn (mg)	1.9	2.8	4.2	8.9
Cu (mg)	0.15	0.33	0.47	0.95

<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, Fifth revised edition -2000-, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan.

<sup>2</sup>The niacin equivalent intake was calculates 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.



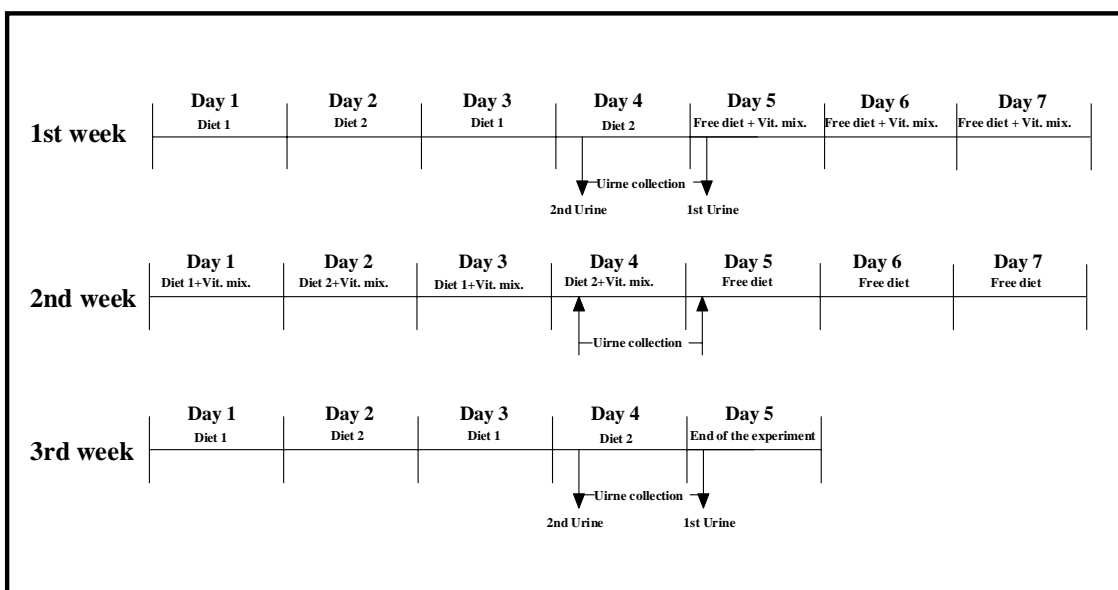


Fig. 1. The Scheme of the Experimental Design

The subjects were fed the diet shown in Tables 1 (diet 1) and 2 (diet 2) followed as in the Figure in the 1st week. In the 2nd week, the respective amount of vitamin mixtures was administered as in the Figure. The administration amount in the 2nd week was divided into 3:4:3 in breakfast:lunch:supper. Urine samples (around 07:00 on Day 4-07:00 on Day 5) were collected and the collected samples were immediately treated as shown in "Materials and Methods". After the urine collection had been finished, the subjects were taken free diet on Day 5-Day 7 on the 1st and 2nd week. "The vitamin mixtures (The objected amount of each water-soluble vitamin was 6-folds for the respective RDA. The following values were chemically measured.)" contains 3.89 mg of thiamin, 5.74 mg of riboflavin, 6.61 mg of pyridoxine, 67.4 mg of nicotinamide, 4.77 mg of pantothenic acid, 1.34 mg of folic acid, 0.182 mg of biotin, and 600 mg of ascorbic acid. In the 3rd week, Only the diets shown in Tables 1 and 2 were fed as shown in the Figure.

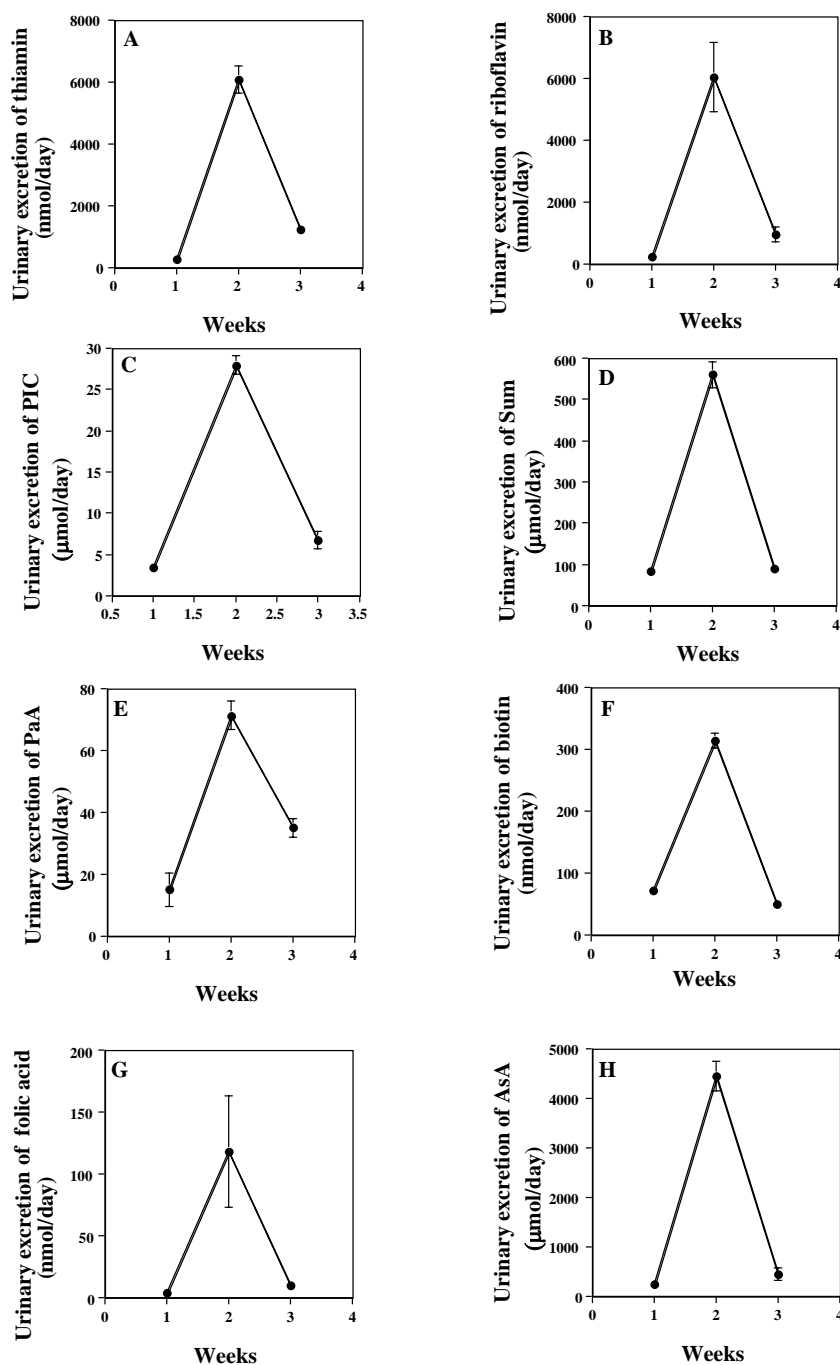


Fig. 2. The Restoration of Urinary Excretory Amounts of Water-soluble Vitamins at One Week After Feeding on a Large Amount of Water-soluble Vitamins. A, vitamin B<sub>1</sub> (thiamin); B, vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin); C, vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxine); D, niacin (nicotinamide), Sum means total amount of niacin catabolites of MNA, 2-Py and 4-Py; E, pantothenic acid; F, folic acid; G, biotin; H, vitamin C (ascorbic acid).