

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

・ 分担研究者・研究協力者の報告書

1 2 . 水溶性ビタミンの食餌摂取基準の妥当性の検討 - 測定技術と基準値の検討 -

分担研究者 橋詰直孝 東邦大学医学部 教授

研究要旨

第六次改定日本人の栄養所要量の策定では、幾つかのビタミンとミネラルについて血液、また血漿（血清）中の濃度を基準値に保ち得る濃度として求められた。基準値は測定方法に依存して変動するので、標準となる方法を定めなければならない。水溶性ビタミンの内、本年はビタミン B₁、ビタミン C について検討した。

A. 目的

ビタミン B₁ は糖代謝に働くビタミンである。現在、B₁ 欠乏による脚気などの臨床症状が認められることは少ないが、その摂取は必須で必要量は食事からとらなければならない。臨床では糖質を高濃度で含む高カロリー輸液（TPN）時に B₁ が欠乏すると、乳酸アシドーシスを惹起し、時に死に至る。健常者、輸液患者での摂取、また投与 B₁ 量は血液濃度を基準下限値以上とするように薦められている。研究の目的は血液濃度を維持できる量を確認することにあるが、本研究では所要量（RDA）が健常女性の血液濃度を維持できるか、また輸液製剤による投与量が処置途中の分解により RDA 量を下回ることがないか調べた。

ビタミン C は抗壊血病作用をもつビタミンであるが、抗酸化剤として働く水溶性ビタミンであり、その摂取が必須である。大六次改定では血漿（血清）ビタミン C 濃度を基準下限値（0.7 mg/dL）以上に保つ量として RDA を求めた。われわれは多くの基礎研究で必要とされている血漿濃度の測定を迅速に（ビタミン C は極めて不安定なので）、かつ大量処理の可能な自動分析方法を開発している。そこでのビタミン C を安定化させ、除蛋白剤として働くメタリン酸の最も適した濃度について検討した。さらに健常者の血液中にもビタミン C を分解してしまうヘモグロビンとトランスフェリンを生理的に含んでいる。ヘモグロビンは赤血球由来でフリーヘモグロビンとして存在する。火傷や 0-175 感染などでフリーヘモグロビンの血漿濃度が増加すると、腎臓の糸球体に詰まり腎障害を起こす。トランスフェリンは、鉄の輸送に働く重要な蛋白質である。本研究では生理的濃度にある

ヘモグロビンとトランスフェリンによるビタミン C の分解を求め、成績の評価に影響を与えるか否か検討した。さらに血清ビタミン C 濃度と血清総抗酸化能との関係、摂取量と血清濃度からビタミン C 栄養の評価値を比較した。

B. 研究方法

1. ビタミン B₁

（1）安定性試験：輸液製剤内でのビタミン B₁ を不安定とする因子として基本液やアミノ酸製剤の安定性を保つ目的で添加されている亜硫酸水素ナトリウムがある。亜硫酸水素ナトリウムはビタミン B₁ を分解する。ビタミン B₁ は酸性 pH では安定ではあるが、アルカリ性では不安定である。日常臨床において行われている点滴ライン（図 1）を通して投与速度で滴下し、針の先端から輸液を採取し、ビタミン B₁ の安定性を調べた。TPN 製剤（表 1：A～F 液）に遮光カバーで遮光した後、室温蛍光灯下（約 1000 ルクス）に放置し、点滴ラインを通じ各投与速度で持続的に滴下し、配合直後、3、6 および 12 時間後に点滴ラインから採取した液についてビタミン B₁（チアミン）を測定した。

（2）投与量と血液中濃度：われわれの以前の研究では、女子学生（19～21 歳）に 9 日間、2.0 mg/日の B₁ を摂取させ、その間、4 回採血して血中 B₁ 濃度を測定した。血中濃度が安定した時に求めた基準範囲は 28-56 ng/mL にあった。本研究では、策定され RDA の確認のために、別の 10 名の女子学生を 7 日間、一定の生活環境（Human study）において、朝食 0.24 mg、昼食 0.32 mg、夕食 0.24 mg、合計 0.8 mg/日の B₁ を摂らせ血中濃度の変化を観察した。また別の 77 名の成人男女について ROC 曲線より基準下限値を検討した。ビタミン B₁ の測定は順相系 HPLC 法（プレカラム

蛍光法)により行った。蒸留水で41倍に希釈した全血0.2 mLに4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液0.03 mL, 臭化シアン0.02 mLおよび2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液0.02 mLを加えて混合し, HPLCに0.05 mL注入した。カラムはAspic NH2P-50 YE (Shodex), 移動相は0.09 mol/L リン酸緩衝液(pH 8.6)・60%アセトニトリルを流速1.2 mL/分で用い, 蛍光強度(En. 375 nm, Em. 430 nm)を求めた。

2. ビタミンC

(1)メタリン酸(MAP)濃度: 100, 200, 300, 400, 500 g/L 濃度のMAP溶液0.02 mLを健常者の新鮮なプール血清(0.18 mL)に添加した(MAPの終濃度は10, 20, 30, 40, 50 g/L)となる。その遠沈上清につきアスコルビン酸濃度を, われわれが開発した自動分析法であるアスコルビン酸酸化酵素(ASO)法で測定し各濃度で比較した。血清中のアスコルビン酸はASOにより酸化型アスコルビン酸になる。酸化型アスコルビン酸はオルトフェニレンジアミンと縮合して蛍光体となる。蛍光の増加速度を340 nmで測定し, アスコルビン酸濃度を求める。自動化法としてCobas Mira S (Roche Diagnostics System)を用いた。血清試料は1/10量の100-500 g/LのMAPで除蛋白して用いた。

(2)ヘモグロビンとトランスフェリン: ヒトホロトランスフェリン(終濃度で0.4~6.6 $\mu\text{mol/L}$)もしくはヘモグロビン(終濃度で27~144 $\mu\text{mol/L}$)を健常者のプール血清に添加し, ビタミンC濃度はASO法で測定した。また別の健康な女性(18~26歳)について血清ビタミンC濃度と血清フリーヘモグロビン濃度, また血清トランスフェリン濃度と比較検討した血清フリーヘモグロビン濃度は分光学的に415, 450, 700 nmで測定した。血清トランスフェリン濃度はネフェロメトリー法(Dade Behring BN ProSpec System)で測定した。

(3)血清ビタミンCと総抗酸化能との関係: 抗酸化ビタミンであるビタミンCの血清濃度と血清総抗酸化能(Total antioxidant status: TAS)を健常成人41名について比較した。血清TASは, フリ-ラジカル(2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride: AAPH)を用い赤血球溶血阻止反応で測定し, Trolox(ビタミンEの代用品で水溶性)当量で表わした。

(4)摂取量と血清濃度: 前のわれわれの研究では, 健康な女子学生54名(18-19歳, 非喫煙者)にビタミンCを150 mg/日を含む試

験食を3日間摂取させて求めた血漿ビタミンC濃度の基準範囲は0.7~1.38 mg/dLにある。本研究では別の58名の女子学生について, 摂取量から評価した血清濃度, そして血清濃度から評価した摂取量についてROC曲線から解析した。血清ビタミンC濃度はASO法で測定した。

C. 研究成果

1. ビタミンB₁

(1)安定性試験: 室温保存した各試料について, 点滴ラインより滴下液を採取し, 外観, pH, 亜硫酸水素ナトリウム濃度, チアミン濃度とチアミン含量の残存率(表2)を経時的に観察した。全ての試料溶液において, 外観変化, pHの経時変化は見られなかった。チアミン含量については, いずれの試料も低下が認められた。12時間投与でのチアミン濃度は, A液及びB液で12時間後の残存率は80%, D液は12時間で84%, F液は87%の残存率であった。24時間投与のチアミン含量の場合, すなわちC液は24時間で57%, E液は12時間で72%の残存率であった。糖およびアミノ酸補液中の亜硫酸水素ナトリウム量と関係しており, 亜硫酸水素塩の含有量の少ない製剤ほどチアミン残存率が大きくなる傾向にあった。24時間投与の場合は, 12時間までの低下傾向と異なり, E液と比べてC液のほうが低下していた。いずれの試料もチアミンの含量低下を示しているため, 短時間での投与にすべきである。累積投与量は, 最も含量低下の大きな24時間投与のB液において約80%であり, チアミンの配合量3.1 mgのうち2.5 mgに相当する。この量はビタミン所要量の指標になっている1 mgの2.5倍量に相当するため, すべての試料ともに必要十分量の投与と考えられた。

(2)投与量と血液中濃度: わが国の第六次改定ではビタミンB₁のRDAを, 男性で1.1 mg/日, 女性で0.8 mg/日としている。女子学生について0.8 mg/日の投与試験では, 試験開始時に血中濃度が27 ng/mLを示す者が1名いたが, 7日後には20 ng/mLまで低下し, また, 開始時に31 ng/mLの者も27 ng/mLとなった(図2)。このことよりRDAの0.8 mg/日は血中濃度を基準範囲に維持できる限界量と考えられた。全血総チアミン濃度のカットオフ値に対して, 20 ng/mLと28 ng/mLの報告があるが, 欠乏症例20例を含む77例のROC解析では28 ng/mLで最も高い病態識別を得た(図3)。

1. ビタミンC

(1) MAP 濃度：標準液 (25 mg/L) の吸光度増加速度は、10-50 g/L (終濃度) の MA 濃度で吸光度増加速度に有意の差を認めなかった。盲検の吸光度増加速度は 0.0000 ~ 0.0001 であった。血清 29 試料について求めたアスコルビン酸濃度は、10 g/L の MAP 濃度では、20-50 g/L 濃度に比べ 0.8-1.0 mg/L 高値にあり、10 g/L 濃度では透明な除蛋白上清を得られなかった。20-50 g/L の MAP 濃度を用いた成績は相互に良好な相関にあった ($r = 0.987-0.998$)。

(2) ヘモグロビンとトランスフェリン：新鮮なプル血清に添加した 33 から 41 $\mu\text{mol/L}$ のトランスフェリン (血清基準範囲：22-45 $\mu\text{mol/L}$)、また 1.9 $\mu\text{mol/L}$ のヘモグロビン (血清基準範囲：0-3.0 $\mu\text{mol/L}$) でアスコルビン酸は有意 ($p < 0.05$) に減少を示した (表 2, 3)。しかしながら生理的濃度から 80 $\mu\text{mol/L}$ までのトランスフェリンによるアスコルビン酸濃度の臨床診断への影響のないことが明らかになった。生理的濃度のヘモグロビンは血清アスコルビン酸測定にほとんど影響しないが、血清放置 (4, 1.5 時間) は低アスコルビン酸濃度の臨床診断を誤らせる。58 例の健康な女子学生の血清ヘモグロビン濃度とトランスフェリン濃度とアスコルビン酸との間に関連性は認められなかった ($r = 0.18$, $p > 0.05$; 図 4)。

(3) 血清ビタミン C と総抗酸化能との関係：抗酸化ビタミンとしてアスコルビン酸、またビタミン E について検討した。血清濃度は TAS とそれぞれ相関係数が、 -0.319 , -0.176 と低く TAS への関与は認められなかった (図 5)。TAS は血清アルブミン濃度と相関した ($r = 0.417$, $P < 0.01$)。

(4) 摂取量と血清濃度：20 歳代の米国での非喫煙女子の RDA は 75 mg/日であることから、基準値を求めた学生の試験開始前の摂取量を調査すると、平均 99 mg/日 (3 ~ 368 mg/日) にあった。摂取量と血漿濃度との関係は相関係数 $r = 0.373$ ($P < 0.001$) にあった (摂取量が US RDA 以下の 26 名について血漿アスコルビン酸濃度が基準下限値以下の者の割合を求めると 15% (5 名) となった。一方、Jpn RDA 以下の者は 39 名、このなかで血漿濃度が基準下限値以下の者は 5 名、13% であつた。ROC 解析の結果 (図 6) は、欠乏症の検出には食事調査による摂取量よりも血清濃度が優れていた。

D. 結論

1. ビタミン B₁

(1) 安定性試験：TPN 用総合ビタミン剤を添加した TPN 製剤について、点滴ラインを通して針の先端から輸液を採取し、投与液に近い状態で採取した試料におけるチアミンの安定性を検討した結果、いずれの試料もチアミン含量の低下を認め、亜硫酸水素塩または pH が安定性に影響していた。しかしながら、1 日以内、特に 12 時間程度の投与時間であれば、臨床上的投与量として全く問題ないと結論づけられた (論文 1)。

(2) 投与量と血液中濃度：成人女子での 0.8 mg/日の RDA は血中濃度を基準範囲に維持できる限界量で、全血総 B1 濃度の下限値は 28 ng/mL で最も高い病態識別にある (論文 2, 3)。

1. ビタミン C

(1) MAP 濃度：酵素法による血清アスコルビン酸濃度の測定では除蛋白が必要とされる。除蛋白試薬には MAP が汎用され、酸性 pH によりアスコルビン酸の安定化にも有効である。MAP 濃度が低いと除蛋白が不十分で、高いと酵素反応を妨害するので、MAP の最適濃度について研究した。これまでの検討で、40 g/L の MAP 濃度で、直線性、測定精度、回収率、HPLC 法との相関、さらに除蛋白血清の安定性において良好な成績を得ているので、MAP 濃度は 40 g/L (終濃度：4 g/L) とした (論文 4)。

(2) ヘモグロビンとトランスフェリン：生理的濃度にあるトランスフェリンとヘモグロビンが血清アスコルビン酸の測定に影響を与えるか否か検討を行った。生理的濃度のトランスフェリンとヘモグロビンは血清アスコルビン酸測定にほとんど影響しない。女子学生では貧血により血清トランスフェリン濃度の増加 (50 $\mu\text{mol/L}$ 以下) を見るが、血清アスコルビン酸濃度に影響を与えないものと考えられた。しかしながら血清放置はヘモグロビン酸化によって低アスコルビン酸濃度の臨床診断を誤らせる (論文 5)。

(3) 血清ビタミン C と総抗酸化能との関係：ビタミン E およびビタミン E の TAS への関与の低さは、血清中に高濃度で含まれるアルブミンの抗酸化能に、それぞれのビタミン E の抗酸化活性が覆い被されているものと考えられている (論文 2)。

(4) 摂取量と血清濃度：摂取量と血清アスコルビン酸濃度は相関係数 0.373 ($p < 0.01$) にある。摂取量からみた欠乏症の推測には、US RDA が適しているようであるが、“第五次改定 Jpn RDA (男女とも 50 mg/日)” で評価

すると欠乏例は含まれず，このエビデンスが単なる偶然なのか，もしくは食事調査の方法が不正確なのか今後の課題とされた．欠乏症の検出には食事調査による摂取量よりも血清濃度が優れている．しかしながら偽陽性率を考慮すると摂取量では 80 mg/日，血清濃度は 0.9 mg/dL をカットオフ値として欠乏を考えるのが妥当であろう（論文 2，3）．

E. 研究発表

- 1) 橋詰直孝，渭原博，志越顕，谷晴仁：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（2003）
- 2) 渭原博，篠良雄，松本信明，橋詰直孝：検査室からみた血中ビタミン測定，臨床化学，32：274-279（2003）
- 3) 渭原博，橋詰直孝：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 127 号：24-30（2003）
- 4) Ihara H, Shino Y, Hashizume N. : Optimum concentration of metaphosphoric acid as the deproteinizing reagent for enzymatic analysis of ascorbic acid in serum. J Anal Bio-Sci 26: 365-368 (2003)
- 5) Ihara H, Shino Y, Hashizume N, Hirano A, Okada M : The assay of ascorbic acid in serum is not affected by physiological concentrations of transferrin and hemoglobin. J Nutr Sci Vitaminol 49: 289-291 (2003)



図1：輸液ライン

表1：TPN製剤の組成

TPN 製剤	TPN 基本液	容量	アミノ酸	ブドウ糖	果糖	キシリトール
A 液	アミノトリパ1号(大塚製薬)	850 ml	25 g	79.8 g	40.2 g	19.8 g
B 液	アミノトリパ2号半日量(大塚製薬)	900 ml	30 g	100.2 g	49.8 g	25.2 g
C 液	アミノトリパ2号1日量(大塚製薬)	1800 ml	60 g	200.4 g	99.6 g	50.4 g
D 液	ユニカリックN 半日量(田辺・テルモ)	1000 ml	29.98 g	175 g	—	—
E 液	ユニカリックN1 日量(田辺・テルモ)	2000 ml	59.96 g	350 g	—	—
F 液	ビーエヌアイン-2号(味の素ファルマ)	1100 ml	30 g	180 g	—	—

表2：チアミン濃度の経時変化

TPN 製剤	チアミン濃度 (mg/l)				
	滴下直後	1 時間	6 時間	12 時間	24 時間
A 液	3.32 ± 0.29 (0)	3.22 ± 0.33 (0.8)	2.95 ± 0.30 (1.5)	2.68 ± 0.19 (2.8)	
B 液	3.24 ± 0.16 (0)	2.99 ± 0.19 (0.7)	2.85 ± 0.19 (1.5)	2.59 ± 0.30 (2.8)	
C 液	1.60 ± 0.10 (0)	1.61 ± 0.13 (0.4)	1.45 ± 0.16 (0.7)	1.36 ± 0.11 (1.4)	0.91 ± 0.03 (2.4)
D 液	2.96 ± 0.10 (0)	2.77 ± 0.19 (0.7)	2.60 ± 0.18 (1.5)	2.48 ± 0.19 (2.9)	
E 液	1.43 ± 0.06 (0)	1.33 ± 0.04 (0.4)	1.27 ± 0.09 (0.7)	1.13 ± 0.07 (1.4)	1.03 ± 0.03 (2.7)
F 液	2.27 ± 0.06 (0)	2.63 ± 0.06 (0.8)	2.42 ± 0.20 (1.5)	2.36 ± 0.12 (2.9)	

数値は5回の実験における平均値と標準偏差を示した。

()内は台形法により計算した累積投与量 (mg)

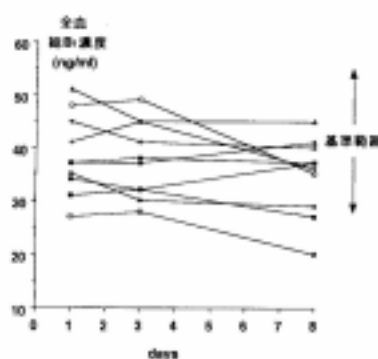
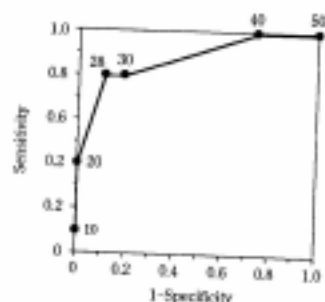


図2: 全血総ビタミンEの経日変化



全血総ビタミンE濃度のROC曲線とカットオフ値
Efficiencyは、カットオフ値 10ng/mlで0.77, 20 ng/mlで0.84, 30ng/mlで0.87, 40ng/mlで0.81, 50 ng/mlで0.45, 50ng/mlで0.36と、30ng/mlで優れていることが理解できる。

図3: 全血総ビタミンE濃度のROC曲線とカットオフ値

表3: アスコルビン酸酸化におよぼすヘモグロビンの影響

Hemoglobin, $\mu\text{mol/L}$	AA in deproteinized serum, $\mu\text{mol/L}^a$	AA by direct analysis of serum, $\mu\text{mol/L}^a$
0.4 ^c	82.2 $\pm$ 0.3 (100) ^b	79.5 $\pm$ 0.3 (100) ^b
0.7	81.9 $\pm$ 1.0 (100)	79.2 $\pm$ 0.9 (100)
1.1	81.9 $\pm$ 0.9 (100)	77.9 $\pm$ 0.8 ^d (98)
1.9	80.6 $\pm$ 0.5 ^d (98)	77.6 $\pm$ 0.8 ^d (98)
3.4	79.7 $\pm$ 1.1 ^d (97)	77.0 $\pm$ 0.8 ^d (97)
6.6	77.3 $\pm$ 1.6 ^d (94)	75.8 $\pm$ 1.3 ^d (95)

^a Values are mean $\pm$ SD of three experiments.

^b Percent of the original concentration is in the parentheses.

^c Significantly ($p<0.05$) lower than the values at 0.4 $\mu\text{mol/L}$ of hemoglobin.

^d Significantly ($p<0.01$) lower than the values at 0.4 $\mu\text{mol/L}$ of hemoglobin.

^e 0.4 $\mu\text{mol/L}$ was the endogenous hemoglobin concentration.

表4: アスコルビン酸酸化におよぼすトランスフェリンの影響

Transferrin, $\mu\text{mol/L}$	AA in deproteinized serum, $\mu\text{mol/L}^a$	AA by direct analysis of serum, $\mu\text{mol/L}^a$
27 ^f	82.6 $\pm$ 0.3 (100) ^b	79.5 $\pm$ 0.3 (100) ^b
33	81.1 $\pm$ 0.7 ^c (98)	78.2 $\pm$ 0.7 ^c (98)
41	81.8 $\pm$ 0.3 ^c (99)	77.1 $\pm$ 0.9 ^c (97)
55	80.5 $\pm$ 1.2 ^c (97)	77.5 $\pm$ 0.9 ^c (97)
81	79.2 $\pm$ 0.9 ^c (96)	77.9 $\pm$ 0.9 ^c (98)
144	76.7 $\pm$ 0.6 ^c (93)	74.1 $\pm$ 1.8 ^c (93)

^a Values are mean $\pm$ SD of three experiments.

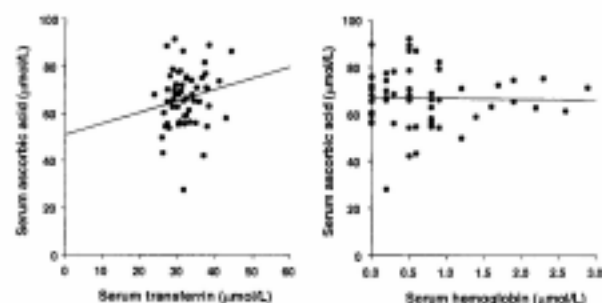
^b Percent of the original concentration is in the parentheses.

^c Significantly ($p<0.05$) lower than the values at 27 $\mu\text{mol/L}$ of transferrin.

^d Significantly ($p<0.01$) lower than the values at 27 $\mu\text{mol/L}$ of transferrin.

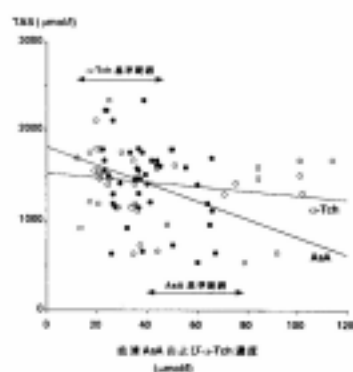
^e Significantly ($p<0.001$) lower than the values at 27 $\mu\text{mol/L}$ of transferrin.

^f 27 $\mu\text{mol/L}$ was the endogenous transferrin concentration.



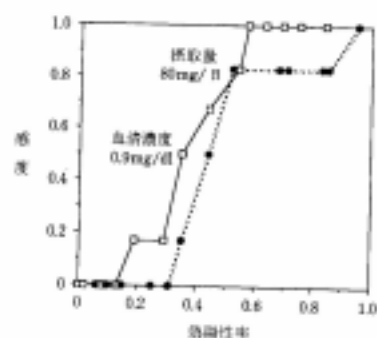
Comparison of serum transferrin and hemoglobin concentrations and serum AA concentrations in 58 sera from healthy women. AA concentrations were determined by the ASKO-5 method. For, transferrin, $r=0.38$ ($p>0.05$); the least squares equation is $Y=0.48X+51$. For, hemoglobin, $r=-0.02$ ($p<0.05$); the least squares equation is $Y=-0.29X+67$.

図4：血清ヘモグロビンならびにトランスフェリン濃度とアスコルビン酸濃度との関係



血清抗酸化ビタミン濃度と血清糖化ヘモグロビンとの関係
糖化ヘモグロビン (TAS) : アスコルビン酸 (AsA : ●) ; ビタミンE (α-Tch : ○)

図5：



ビタミンC欠乏症のROC曲線からみた感度と偽陽性率

カットオフ値は、摂取量(●)では80mg/日、血清濃度(○)では0.9mg/dlが求められた。欠乏症の検出は摂取量よりも血清濃度のほうが優れた指標のようである。

図6：