

平成 13 年度厚生科学研究費（21 世紀型医療開拓推進研究事業）

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

分担研究報告書

葉酸とビタミン B₁₂ の測定方法と基準値

分担研究者 橋詰直孝 東邦大学 教授

研究要旨 第六次改定日本人の栄養所要量-食事摂取基準-において、ビタミン B₁₂ および葉酸の栄養所要量が初めて策定された。策定された所要量の二品人でのデータが少ないので、日本人とその妥当性は問題がないか否かについて検討を加えた。そのため、測定法の標準化と基準値の設定が必要である。そこで、本年度は葉酸とビタミン B₁₂ の測定法と基準値の検討を行い、成果を得た。

A. 目的

米国の栄養所要量 (RDA) の策定では葉酸の平均必要量 (EAR) は血清葉酸濃度、赤血球葉酸濃度、血漿ホモシステイン濃度、血液学的検査（赤血球数、網赤血球数、平均赤血球容積値、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度）を基準範囲に維持できる食事と定めた。

また、米国のビタミン B₁₂ の EAR は血液学的検査（赤血球、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積値、網赤血球数）と血清ビタミン B₁₂ 濃度を基準範囲に維持する食事摂取量で、血清ビタミン B₁₂ 濃度の基準下限値は 200 pg/ml となっている（EAR = 2.0 μg/日 RDA = 2.4 μg/日）。わが国の第六次改定でも保つべき血清ビタミン B₁₂ 濃度を 200 pg/ml とし、EAR と RDA は、それぞれ、2.0 μg/日と 2.4 μg/日となっている。

しかしながら、わが国の第六次改定の策定で用いられた成績は欧米の報告を基にし

ており、血清葉酸濃度の下限値 3 ng/ml は微生物学的定量法で求められており、血清ビタミン B₁₂ 濃度の基準下限値 200 pg/ml はバイオラッド社のラジオアッセイを用いた成績である。我々は、日本国内で利用可能な分析技術を明らかにし、その方法での成績の集積が必須と考え、「葉酸とビタミン B₁₂ の測定方法と基準値」に関する検討を行った。

B. 研究方法

従来、葉酸とビタミン B₁₂ の測定方法は微生物学的定量方法とラジオアッセイが用いられてきたが、近年、化学発光免疫測定法に基づく自動分析法が主流となっている。今回、わが国で入手が可能な自動分析法として、葉酸とビタミン B₁₂ についてアクセス（ベックマン・コルラー社）、エクルーシス（ロッシュ・ダイアグノスティクス社）、ケンタウルス（バイエル・メディカル社）を選び用いた。欧米では、バイラッド社のラジオアッセイや自動分析のイムライト、ア

スシム，IMX などもあるが，わが国では認可されていない。

研究の方法は，Step 1 としてビタミン標準血清（VRS，日水制約株式会社）と健常者のプール血清について，上記 3 機種で測定した葉酸濃度とビタミン B₁₂ 濃度の分析値を比較して測定機器および施設間差の収束を計る。

ついで，Step 2 として上記 3 機種で健康な大学生について血清葉酸濃度とビタミン B₁₂ 濃度の測定を行う。Step 2 の被験者は不定愁訴の問診票を行い，スコアの低い者を選んだ。血清葉酸濃度とビタミン B₁₂ 濃度の測定とともに，赤血球数，網赤血球数，平均赤血球容積値，ヘマトクリット値，ヘモグロビン濃度，血清鉄，総鉄結合能，血清フェリチン濃度，血漿ホモシステイン濃度に以上を認めないグループより基準値を設定する。

C. 研究結果

Step 1：VRS はヒト血清をベースに，レチノール，トコフェロール，アスコルビン酸，チアミン，葉酸とビタミン B₁₂ を添加してある。凍結乾燥状態で冷凍庫に保持し，蒸留水 2.0 ml で溶解して用いる。溶解後の安定性は遮光，冷蔵庫で 5 時間まで保証された。

溶解量を蒸留水 4.0 ml として，マトリックス効果を見ると，葉酸とビタミン B₁₂ 以外のビタミンで直線性が得られた。葉酸とビタミン B₁₂ では 4.0 ml 溶解で 2.0 ml 溶解から求めた 1/2 値の約 80%（葉酸），90%（ビタミン B₁₂）となった。

3 本の VRS を，それぞれ 2.0 ml で溶解して，各機種で測定して平均値を求めると，

葉酸についてはアクセス 12.28 mg/ml，エクルーシス 13.45 ng/ml，ケンタウルス 11.13 ng/ml を得た。ビタミン B₁₂ についてはアクセス 1175 pg/ml，エクルーシス 1189 pg/ml，ケンタウルス 1165 pg/ml を得た。各機種における 3 本の測定値の変動係数は，葉酸で 3%以下，ビタミン B₁₂ で 5%以下にあった。

Step 2：はじめに118名の健康な女子学生について，疲労度，気力，体調などについて不定愁訴の問診を行った。このうち，スコアが20以下と低い者を選び，さらに，喫煙，飲酒，ビタミン剤のサプリメントを習慣にしている者は除いた。その結果，58名が選択でき，年齢は18歳から24歳であった。血清ビタミンB₁₂と葉酸濃度のヒストグラムでは，1例のみが，従来報告されている葉酸の基準値以下にあったが，他の57名の被験者はビタミンB₁₂，葉酸とも低値を示すものはいなかった。

血清ビタミンB₁₂濃度について3機種での分析値を比較すると，3機種とも0.9以上の相関係数にあったが，58例の平均値においてエクルーシスが高値の傾向であった。

葉酸濃度も，3機種とも0.8以上の相関係数にあったが，58例の平均値においてケンタウルスの測定値が高値の傾向であった。

次に，Step 2の，選択基準，すなわち，基準下限値を検討した。

血液学的検査は赤血球数が380万以上，ヘモグロビン濃度11.5 g/dl以上，平均赤血球容積 85 fl以上，網赤血球数4プロミル，ホモシステイン濃度14 μmol，血清鉄48 μg/dl以上，血清フェリチン濃度3.9 ng/ml以上とした。

58例全例のビタミンB₁₂濃度は669 ± 232

pg/mlにあり，95%分布範囲は313～1270 pg/mlにあった．今回の58例では，4例が血液学的検査および鉄の両検査，ともに低値を示し，除外した．したがって，最終的には54例が被検者として残った．除外された4例のビタミンB₁₂濃度の平均値は530 pg/mlと，選択された54例の679 pg/mlより低い値であったが，統計学的な有意差は認められなかった．なお，ホモシステイン濃度で，はずれた者が1例認められたが，血液学的検査および鉄検査には異常が認められず，ビタミンB₁₂濃度も557 pg/mlと低値ではなかった．

以上のことから，血液学的検査，鉄検査およびホモシステイン濃度を通過した53例の95%分布範囲は322～1286 pg/mlとなったが，選択前と比較して著しい変化はなかった．

58例全例の葉酸濃度は 5.3 ± 2.3 ng/mlにあり，95%分布範囲は2.1～11.2 ng/mlにあった．血液学的検査および鉄検査で，除外された4例の葉酸濃度の平均値は5.9 ng/mlであり，選択された54例の5.2 ng/mlより高い値であったが，統計学的有意差は認められなかった．ホモシステイン濃度で，はずれた1例の葉酸濃度は，3.0 ng/mlと低目で，ホモシステイン濃度を葉酸濃度は相関係数0.37と有意な負 ($p < 0.001$) の相関にあった．血液学的検査，鉄検査およびホモシステイン濃度を通過した53例の95%分布範囲は2.1～11.2 ng/mlと，選択前と同じであった

女子学生のビタミンB₁₂の成績では，アクセスとケンタウルスに比較して，エクルーシスが平均値において有意に高めの値であったので，その基準下限値も322 pg/mlと高

めであった．アクセスとケンタウルスは，ほぼ等しい下限値であった．

Step 1では，ビタミン標準血清で3機種とも同等の値が出たが，予測外の成績であった．しかし，プル血清での補正によりある程度の改善が可能となった．

女子学生の葉酸の成績では，アクセスとエクルーシスに比較して，ケンタウルスが平均値において有意に高めの値であったので，その基準下限値も4.8 ng/mlと高めであった．アクセスとエクルーシスの下限値はそれぞれ，3.0 ng/mlと2.1 ng/mlにあった．葉酸濃度については，ビタミン標準血清，プル血清でも補正ができなかった．

以上の成績より，第6次改定で用いた，ビタミンB₁₂濃度の基準下限値，200 pg/mlおよび，葉酸濃度の基準下限値，3 ng/mlは，その絶対値の検討だけでなく，機種間差も含め研究していくことの必要性が示唆された．

D. 考察

五訂日本食品標準成分表に掲載されている葉酸とビタミンB₁₂は，微生物法により測定された値である．この微生物的定量方法は精度において，今回の化学発光免疫測定法に基づく自動分析法に比べて低く，かつ熟練を要する．しかしながら，この自動分析方法を食品には適用することはできない．ヒトにより血清は成分が異なるというレベルと食品にはいろいろな成分が含まれているというレベルには相当な開きがあるからである．食品に比べれば，ヒトが異なっても血清成分は同じであるといえる．従って，化学発光免疫測定法に基づく自動分析法に影響を与える血清成分を一度明らかにしておき，改良を加えれば，それ以降精度の高

い値を得ることができるからである。一方、五訂日本食品標準成分表に掲載されているすべての食品にこの改良を加えることは不可能である。そこで、未だに微生物学的定量法が使われている。微生物学的定量法にも問題点がある。それは、葉酸定量に用いられる *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 がレスポンスする葉酸の種類が特定されていないこと、ビタミン B₁₂ の定量に用いられる *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830 がレスポンスするビタミン B₁₂ の種類が特定されていない点である。さらに測定方法そのものの精度が低いことである。

いずれにしても、食品中の定量方法と栄養状態の指標として使われる定量方法とが一致しない点は、ビタミンの出納実験を行う上で、特に EAR を設定する実験では致命的である。自動分析法は熟練した技術を習得する必要もないため、予算上（機器が高価だる）の問題点をクリアできれば、研究室レベルでも普及するであろう。そのようになれば、食品中の葉酸とビタミン B₁₂ も精度高く測定できるようになるであろう。ビタミンの定量を行っている研究者で知恵を絞りあい、より精度の高い測定方法に改良してゆくことも我々研究班の目的であるので、引き続き、葉酸とビタミン B₁₂ の測定方法に関して実験を重ねる。

なお、製造会社間による測定値の変動の原因については、明らかではない点もあるので引き続き検討を加える。また、この自動分析方法における葉酸とビタミン B₁₂ の測定の保証は血清のみであり、水溶性ビタミンの栄養状態の指標として使われる尿は保証の対象外である。尿もこの自動分析法

で測定できるように改良する必要がある。それには、ビタミン B₁₂ に関しては、感度を上げることも必要である。

E. 結論

五訂日本食品標準成分表に掲載されている葉酸とビタミン B₁₂ の測定方法は微生物学的定量方法である。一方、栄養状態の指標としては、近年、化学発光免疫測定法に基づく自動分析法が用いられることが主流となってきた。この自動分析方法は、基本的には微生物学的定量方法よりも優れているが、實際上、まだ多くの改良点が要求される。改良すべき点を上げ、製造会社の協力の基に測定できる試料範囲を広げ、感度を高めたい。

F. 健康危機情報

特記する情報はなし。

G. 研究発表

1. 論文発表
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. 実用新案登録
なし
3. その他
なし