

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する基礎的研究

平成 16 年度～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 柴田 克己

I. 総合研究報告

7. ビタミン C と葉酸の必要量に関する検討

分担研究者 梅垣 敬三 国立健康・栄養研究所

要旨

ビタミンの必要量ならびに上限摂取量の策定には、信頼できる分析法の設定、摂取量を反映する適切な生体指標の選定、有用性評価に関する情報が要求される。そこで本研究ではビタミン C と葉酸を取り上げ、分析法、摂取量を反映する生体指標、有用性評価において注目すべき事項を検討することとした。その結果、ビタミン C 分析法としては電気化学検出 (ECD) -HPLC 法が食品中と微量の生体試料の分析にも適用できる信頼できる方法であること、また葉酸の分析法はクロラムフェニコール耐性の *L.casei* を用いた微生物学的測定法が簡便であり、多様な化学形態の葉酸分析には適していることを示した。ビタミン C の体内レベルの評価において、酸化ストレスを受けている糖尿病患者では血漿ビタミン C 濃度は低下せず、リンパ球ビタミン C 濃度が低下するという現象を認め、リンパ球中のビタミン C 濃度が必要量を考慮する一つの指標になりうることを示した。葉酸については、その染色体の安定化に着目した検討を動物実験と被検者実験において行い、組織中の葉酸が飽和する以上の葉酸の摂取には有益な影響が認められないことを示した。ラットを利用した食品中の葉酸の生体利用率の評価系を設定し、日本人の葉酸の供給源と考えられる緑茶中葉酸の生体利用率が低いことを明らかにした。また動物実験において酸化ストレスを負荷すると体内葉酸レベルが低下することから、酸化ストレスが葉酸の必要量を考慮する要因になりうることを示した。

A. 研究目的

ビタミンの食事摂取基準策定において食事からのビタミンの摂取量と体内レベルを把握することが重要になる。そのためには食品ならびに生体試料中のビタミンが迅速かつ適切に分析できる方法・条件の設定、ビタミンの生体内レベルを適切に評価できる生体指標の選定が要求される。またビタミンの必要量を考慮すべき要因についても検討も必要である。

ビタミンCも葉酸も不安定であり、その測定のために適切な前処理が必要である。ビタミンCの測定法については、一般に食品中のビタミンCは通常ヒドラジン-ECD-HPLC法で測定されているが、電気化学検出(ECD)-HPLC法による分析が容易と考えられる。葉酸については、食品中ならびに生体試料中でも多様な形態で存在しており、全ての葉酸を測定するには微生物学定量法が適している。

ビタミンの必要性を判断する指標としては、血漿ビタミンC濃度が測定されているが、生体内レベルを反映するものとして白血球中の濃度が注目されている。葉酸の必要量は血漿や血球の葉酸濃度、ならびに血漿ホモシステイン濃度が利用されているが、葉酸は染色体の安定性に寄与することから、染色体の安定性を指標とした葉酸の必要性の評価法もある。また葉酸については食品中の生体利用性が低く、食品によってもその利用性が異なると考えられている。日本人の葉酸の摂取において日常摂取している緑茶由来の葉酸の寄与率が高いとの報告があるが、緑茶中の葉酸の生体利用性につい

て検討した報告は見当たらない。

そこで本研究では、ビタミンCと葉酸について、食事摂取基準の策定に参考となる分析方法、体内レベルの評価指標などについて検討した。

B. 研究方法

1) 理化学的な分析方法

ビタミンCはヒドラジン-UV-HPLC法ならびに既報のECD-HPLC法で行った。食品の分析試料は細切したのち5%メタリン酸溶液とケイ砂で磨砕抽出し、適宜希釈してヒドラジン-UV-HPLC法ならびにECD-HPLC法による分析試料とした。血液は肘正中皮静脈より採取し、直ちに4℃、 $1,000 \times g$ で15分間、遠心分離して血漿を採取した。この残りの白血球層を別に分取して1 mlの2 mM EDTA 含有PBSと混合後、Ficoll-Paque™ PLUS 0.2 mlを下層に注入し、室温、 $4,500 \times g$ で4分間遠心してリンパ球層を分離した。得られたリンパ球は2 mM EDTA 含有PBSで数回洗浄の後、5%メタリン酸に懸濁させ、ECD-HPLC法による分析試料とした。HPLC-ECDの分析条件としては、カラムに資生堂カプセルパック C18 (UG120, 4.6 x 100 mm)を用い、移動相は200 μ M EDTA及び500 μ M 塩化n-ドデシルトリメチルアンモニウム含有200 mM リン酸-リン酸カリウム緩衝液 (pH 3.0) , 流速は0.9 ml/min, ECD 加電圧は+350 mV (Ag/AgCl) , 試料の注入量は2 μ lとした。ヒドラジン-UV-HPLC法の分析条件としては、カラムにセンシュー科学 Silica-2150-N (100) 6 mm x 150 mm)を用い、移動相は酢酸・n-ヘキ

サン・酢酸エチル混液 (1 : 4 : 5 v/v/v), 流速は 1.5 ml/分, 検出器は可視吸光検出器 (495 m), 注入量は 20 μ l とした.

葉酸の測定はクロラムフェニコール耐性 *L.casei*(ATCC27773)を用いた微生物学的方法を採用した. 葉酸標準品はホリニン酸カルシウム塩五水和物, 葉酸定量用培地は Difco 社製を利用した. 菌体の濁度はマイクロプレートリーダー (コロナ電気株式会社)を用いて測定した. 葉酸測定用の試料調製として, 血漿は 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で適宜希釈し, 全血はポリグルタミン酸鎖を切断するため 37°C, 30 分インキュベートし, その後 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で適宜希釈した. 臓器は 9 倍量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH6.1, 0.5%アスコルビン酸) を加えてホモジナイズした後, オートクレーブで 121°C, 30 分間加熱し, 葉酸を抽出した後に遠心 (2500 \times g, 15 min, 4°C) した上清をラット血清由来のコンジュガーゼで処理し測定試料とした. なお, ラット血清由来のコンジュガーゼは, 活性炭処理して混在する葉酸を除去して利用した.

2) 生体指標に関する動物実験

葉酸投与後の体内葉酸レベルを評価する目的で, 市販固形試料 CE-2 (日本クレア(株))を自由摂取させた Wister 系雄ラット (7 週齢) に単回, あるいは 1 日一回 7 日間, 葉酸 0.33 mg/kg 体重(0.1 mg/0.4 mL/300 g 体重)を胃内投与し, その後の血漿と赤血球の葉酸濃度の変動を測定した. また, 茶中の葉酸の生体利用率を検討するため Wister 系雄

ラット (7 週齢)に AIN-93G4 組成を基本に調製した低葉酸食 (葉酸無添加), もしくは基本食 (葉酸 2 mg/kg 飼料) を 3 週間自由摂取させて組織中の葉酸濃度を低下させ, その後にラットを①コントロール群 水, ②カテキン群 EGCg 29.3 mg/kg BW, ③葉酸群 Folic acid 116.7 μ g/kg BW, ④葉酸+カテキン群 Folic acid 116.7 μ g/kg BW + EGCg 29.3 mg/kg BW, ⑤緑茶群 208.6 mg/kg BW (Folic acid 116.7 μ g/kg BW, EGCg29.3 mg/kg BW 含有)の 5 群に分け, 該当するカテキン, 茶抽出物, または葉酸をそれぞれ 1 週間胃内投与した.

3) タミン C の生体指標に関するヒト試験

糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミン C 濃度を測定した. 被験者は 41 人の 2 型糖尿病患者 (平均年齢 63 歳, 男性 25 人と女性 16 人)であり, 空腹時の血糖は 137 mg/dl, ヘモグロビン A1c 7.1%であった. またこれらの患者の中で合併症のある患者は 26 人, 合併症のない患者は 15 人であった. 対象とした健常人は年齢ならびに性別を合わせた 50 人 (男性 31 人と女性 19 人)であった.

4) 色体の安定性を指標とした葉酸の必要量に関する検討

動物実験では 4 週齢 ICR 系雄マウスに AIN-93G 組成を基本に調製した低葉酸食 (葉酸無添加), 基本食(葉酸 2mg/kg 飼料), 高葉酸食(葉酸 40 mg/kg 飼料)の 3 種類の固形飼料を 4 週間摂取させた後, X 線(0.5 Gy)を無麻酔下で全身照射して骨髄染色体損傷を誘発し, 骨髄染色体損傷を小核試験によ

り評価した。同時に組織中の葉酸濃度も測定した。被検者実験では、20代健常男性22名(平均年齢23歳)を対象とし、10名を対照群、12名を葉酸投与群として、葉酸投与群には800 µg/日の葉酸を2週間投与した。被験者の食事記録と葉酸摂取の確認を行い、試験開始・終了時の空腹時に静脈血を採取し、リンパ球染色体損傷はサイトカラシンBを用いた小核試験法により評価した。

酸化ストレス負荷による体内葉酸濃度の変化についての検討は、マウスに種々の線量のX線照射し、骨髄、肝臓、血漿の葉酸濃度の変動をビタミンCやEと比較検討した。

(倫理面への配慮)

実験は倫理委員会の承認を得た後、個人情報等や倫理に関係した事項を遵守して行った。

C. 研究結果

1) ビタミンの信頼できる分析方法の設定

17種類の野菜や果物のビタミンCの測定をヒドラジン-UV-HPLC法とECD-HPLC法と比較したところ、総ビタミンC(還元型+酸化型)としては同様の値を得ることができた(図1)。また、ECD-HPLC法により測定した野菜や果物中のビタミンCはほとんどが還元型であった。図2に示したようにヒドラジン-UV-HPLC法に比べて、

ECD-HPLC法は、測定操作のステップが少なく、また酸化型と還元型の両方を迅速、簡便、高感度に測定できるという特徴があった。ビタミンCの生体内濃度を反映する指標としては、血漿と血球があるが

ECD-HPLC法では微量の白血球でもビタミンCが十分に測定できた。また血球の中でリンパ球は、細胞の調製が容易に短時間に調製できることから、体内ビタミンCレベルの評価対象試料として適していた。

葉酸の分析は、クロラムフェニコール耐性L.casei(ATCC27773)を用いた微生物学的方法とマイクロプレートを利用した方法が簡便で優れた方法と考えられた。この方法では20 pM から400 pMの範囲内では菌株の生育反応曲線を得ることができ、測定感度も高かった。検出限界はおよそ5pMと考えられた。測定感度が高いことから定量に使用する器具類等は、葉酸が混入しないように十分注意する必要があった。

2) 生体指標に関する動物実験

ラットの実験において葉酸を1回、または7日間連続経口投与したとき、血漿では葉酸投与によるその濃度の増加をある程度検出できたが、赤血球では検出することはできなかった。低葉酸食で3週間飼育したラットに葉酸を経口投与した条件においても、葉酸投与によるその濃度の増加は血漿では検出できたが赤血球では検出できなかった。この結果は、少なくとも1週間程度での葉酸投与の影響は、赤血球では評価できないが、血漿ではある程度評価できることを示唆した。

葉酸欠乏食で4週間飼育したラットに葉酸あるいは緑茶(葉酸含有)を1週間投与したところ、血漿、肝臓の葉酸は、葉酸投与では有意に増加し、また低葉酸状態で増加していたホモシステイン濃度の低下も認

められた。しかし、緑茶では組織中の葉酸濃度の増加も僅かであり、血漿ホモシステイン濃度の低下もほとんど認められなかった。この結果から、緑茶の葉酸は生体利用性が低いことが示唆された。

3) ビタミンCの生体指標に関するヒト試験

糖尿病患者では血漿ビタミンC濃度は健常者と差異はなかったが、リンパ球中のビタミンC濃度が健常者に比べて有意に低かった(図3)。さらに合併症を持っている患者のリンパ球ビタミンC濃度は、合併症を持たない患者に比べて有意に低かった。この結果から、リンパ球中のビタミンC濃度の変動がビタミンCの必要性を評価する一つの指標になりうることを示唆された。

4) 染色体の安定性を指標とした葉酸の必要量に関する検討

マウスの実験において、4週間の低葉酸の負荷のみでは骨髄染色体損傷度の増強は認められなかったが、X線全身照射した条件では骨髄染色体損傷が低葉酸食群で著しく高かった(図4)。一方、基本食群と高葉酸食群では差異がなかった。これらのX線照射による染色体損傷は骨髄葉酸濃度とよく対応していた。すなわち低葉酸食群で低く、基本食群と高葉酸食群では差異がなかった。血漿の葉酸濃度は飼料中の濃度と対応し、低葉酸群、基本食群、高葉酸食群の順に高くなった。この結果は、血漿葉酸濃度が飽和していない条件でも組織中の葉酸濃度が飽和していることを示唆した。体内

葉酸レベルを示す生体指標の1つである血漿ホモシステイン濃度も基本食群と高葉酸食群の間に差はなかったことは、血漿よりも組織中の葉酸濃度が体内状態を反映するよい指標であることを示した。被検者実験では、血漿葉酸濃度は葉酸投与群において増加したが、血漿ホモシステイン濃度は葉酸投与による影響を受けなかった。そしてX線照射の有無にかかわらずリンパ球染色体損傷は葉酸投与で全く影響を受けなかった。この結果はマウスの実験同様、被検者のリンパ球葉酸濃度が飽和しており、葉酸投与の影響が出にくいことを示唆した。

酸化ストレス負荷による体内葉酸濃度の変化を検討するため、マウスに種々の線量のX線照射し、骨髄、肝臓、血漿の葉酸濃度の変動をビタミンCやEと比較検討した。その結果、X線照射により血漿、骨髄の葉酸が照射線量と照射後の時間に依存して低下した。特に血漿ではよく知られている抗酸化ビタミンのEやCに変動はないが、葉酸は有意に低下した。この現象を確認するためインビトロでマウスの血漿にX線(3 Gy)を照射したところ、この条件においても葉酸は有意に減少したが、ビタミンCとビタミンEの濃度に変化は認められなかった(図5)。

D. 考察

葉酸は多様な形態を有する化学物質の総称であり、それらを全て分析するには葉酸要求性の菌体を利用した微生物学的定量法が適している。微生物学的定量法の中でもクロラムフェニコール耐性の *L.casei*

(ATCC27773)を利用し、また多検体の処理が可能で96 wellマイクロプレートを利用した方法が優れた方法と考えられる。一方、ビタミンCについては、今回の研究で検討したECD-HPLC法が、検出感度が高く、また測定操作も簡単で、食品だけでなく血漿やリンパ球中の濃度の測定にも適していると考えられる。特に生体のビタミンCレベルを評価するとき、リンパ球中の濃度が組織濃度を反映すると考えられることから、僅かしか得られないリンパ球中のビタミンC測定にはECD-HPLC法が優れていると考えられる。ただし、この方法はアスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸の形態までは測定できるが、それ以上に酸化された場合には測定できない。そのため測定試料の前処理、分析までの試料の保存に注意しなければ、正確な分析はできないという難点もある。ECD-HPLC法を利用したリンパ球中のビタミンC濃度を糖尿病患者を対象として測定し、酸化ストレスが負荷されている患者では、血漿のビタミンCレベルは低下しないが、リンパ球ビタミンCレベルは低下し、その低下は合併症があるほど著しいことを示すことができた。

体内の葉酸レベルを反映する指標として、血漿、赤血球がよく利用されている。血漿は、摂取した葉酸の短時間の変動をよく反映するが、赤血球はその循環血液中の寿命が長いことから、短期間（少なくとも検討した1週間適度）の葉酸負荷の影響を評価することは難しいと考えられる。類似した現象はビタミンCについても言える。すなわち摂取した食品中からの吸収は、血漿で

感度よく測定できる。言い換えれば、血漿のビタミンCや葉酸濃度は、採血前に摂取したものの影響を受けやすく、定常的レベルは反映しにくいとも解釈できる。

食品中の葉酸の生体利用性は、低いといわれているがその生体利用性を評価する適切な方法は見当たらない。そこでラットに低葉酸食を4週間負荷し、その後に検討する葉酸含有食品を負荷して、血漿、肝臓、骨髄の葉酸レベルの増加、ならびに血漿のホモシステイン濃度の低下を指標とした食事葉酸の有用性の評価方法を設定した。この方法を利用して実際に日本人の葉酸のよい供給源といわれている緑茶葉酸の生体利用性を評価したところ、利用性が低いことが明らかとなった。今回設定した方法を利用すれば、多種類の食品中の葉酸の生体利用性をスクリーニングすることが可能と考えられる。

葉酸はメチル基供与を介して染色体の安定化に寄与していると考えられている。そして食事摂取基準の策定においても、葉酸レベルとリンパ球染色体の安定化の関連が一部で注目されている。今回のマウスを利用した研究において、低葉酸状態ではX線照射による骨髄染色体損傷が起きやすかった。しかし、基本食の20倍の葉酸を投与しても、さらなる染色体損傷の防御効果は認められなかった。被検者に葉酸を過剰投与しても、マウスの実験と同様にリンパ球染色体損傷に対する葉酸の影響は検出できなかった。これらの結果を総合すると、葉酸は血球や組織中が飽和していればそれで十分であり、過剰に摂取する意味はないもの

と考えられる。組織内の葉酸の飽和については、血球中の葉酸濃度の測定と血漿ホモシステイン濃度から推測することができると思われる。また、マウスの実験から、葉酸は酸化ストレスに対して不安定であり、酸化ストレスが負荷される条件ではその要求量も高くなることが示唆された。

E. 結論

ビタミン C と葉酸を取り上げ、分析方法、摂取量を反映する生体指標、有用性評価において注目すべき事項を検討し、ビタミン C の分析法としては電気化学検出 (ECD) -HPLC 法が食品中だけでなく微量の生体試料 (リンパ球等) の分析にも適用できる信頼できる方法であること、また葉酸の分析法として *L. casei* (ATCC27773) を用いた簡便な微生物学的測定法が優れていることを示した。また、リンパ球ビタミン C 濃度が、その必要性を評価する指標になりうることを糖尿病患者の検討から示した。動物実験と被検者実験において染色体の安定性に着目した葉酸の有用性に関する検討を行い、組織中の葉酸が飽和した状況でさらに葉酸を摂取しても有効な影響は認められないことを示した。ラットにおいて食品中の葉酸の生体利用率の評価系を設定し、日本人の葉酸の供給源と考えられる緑茶中の葉酸の生体利用率が低いことを明らかにした。また動物実験において、酸化ストレスが葉酸の必要量を考慮する要因になりうることを示した。

F. 健康危機情報

特記する情報なし

G. 研究発表

1. 発表論文

1) Yamada, H., K. Yamada, M. Waki, and K. Umegaki, Lymphocyte and plasma vitamin C levels in type 2 diabetic patients with and without diabetes complications. *Diabetes Care*, 2004. 27(10): p. 2491-2.

2) Endoh K., Murakami M., Araki R., Maruyama C., and Umegaki K., Low folate status increases chromosomal damage by X-ray irradiation, *Int. J.Radiat.Biol.*, 2006, 82, 223-30.

3) Endoh K., Murakami M., and Umegaki K., Vulnerability of folate in serum and bone marrow to total body irradiation in mice, *Int. J.Radiat.Biol.*, 2007, 83, 65-71.

2. 学会発表

1) 山岸あづみ, 瀧本秀美, 杉山朋美, 呉堅, 山田和彦, 梅垣敬三: ヒトにおけるビタミン C の生体利用性に関する基礎的研究, 第 58 回日本栄養・食糧学会 (仙台) 平成 16 年 5 月 22 日.

2) 山田薫, 脇昌子, 秋山礼子, 山田浩, 梅垣敬三: 糖尿病患者における緑茶飲用, 血漿および白血球ビタミン C と糖尿病性合併症との関連に関する検討. 日本内科学会第 101 回年会 (東京) 平成 16 年 4 月 8~10 日.

3) 遠藤香, 村上昌弘, 杉澤彩子, 木村典代, 山田和彦, 梅垣敬三: ラットにおける

体内葉酸レベルの評価方法に関する検討，
第 52 回日本栄養改善学会学術総会(徳島)，
平成 17 年 9 月 29 日．

4) X 線照射マウスの骨髄染色体損傷に対
する葉酸の防御作用：遠藤香，村上昌弘，
木村典代，山岸あづみ，山田和彦，梅垣敬
三，平成 16 年第 51 回日本栄養改善学会学
術総会，金沢，2004 年 10 月

5) 骨髄染色体損傷に対する葉酸の防御作
用 ～X 線照射マウスにおける検討～：遠
藤香，村上昌弘，杉山朋美，山岸あづみ，
木村典代，山田和彦，梅垣敬三，平成 17 年
第 59 回日本栄養・食糧学会大会，東京，2005
年 5 月

6) X 線全身照射マウスの体内葉酸濃度と
抗酸化ビタミンの変動に関する検討：遠藤
香，村上昌弘，梅垣敬三，平成 18 年第 58
回日ビタミン大会，東京，2006 年 5 月

H. 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

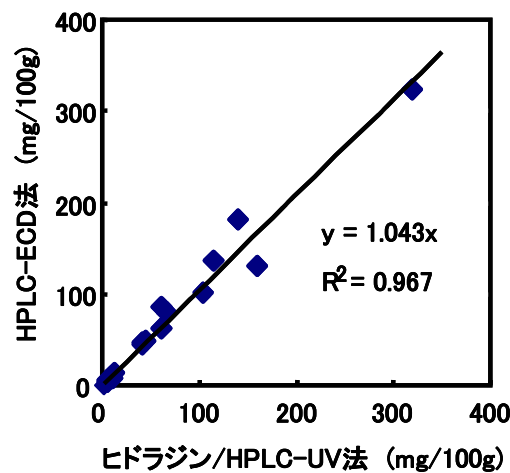


図1. 野菜と果物のビタミンC含量の測定におけるECD-HPLC法とヒドラジンHPLC法の比較. 17種類の野菜と果物のビタミンC含量をECD（電気化学検出）-HPLC法とヒドラジン-HPLC法で測定した.

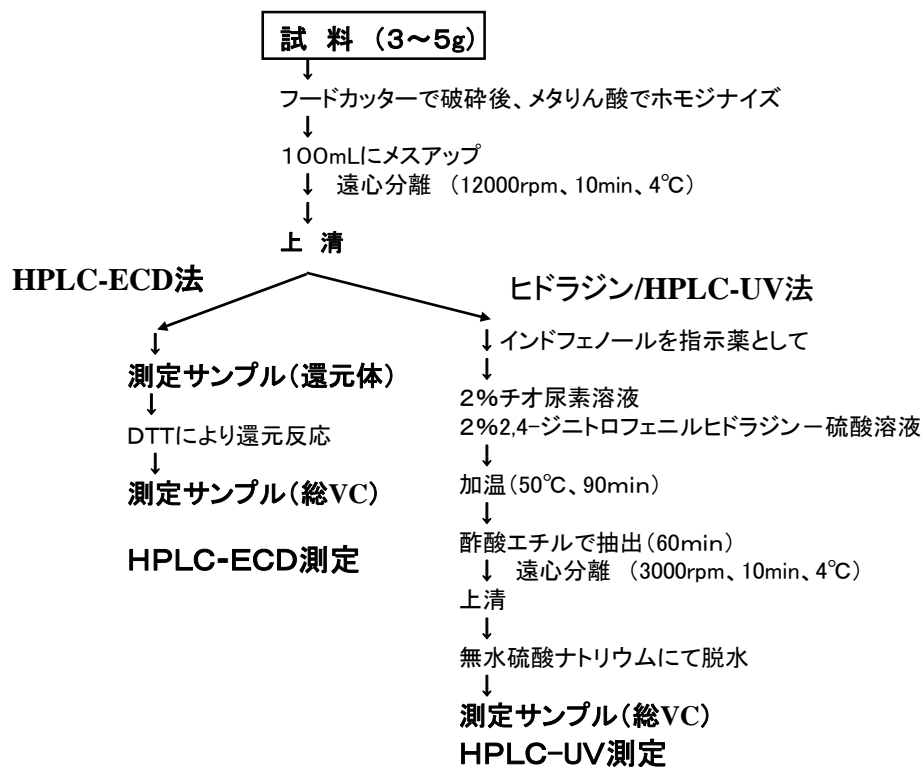


図2. 電気化学検出（ECD）HPLC法ならびにヒドラジン-UV-HPLC法による食品中のビタミンC測定方法の概略

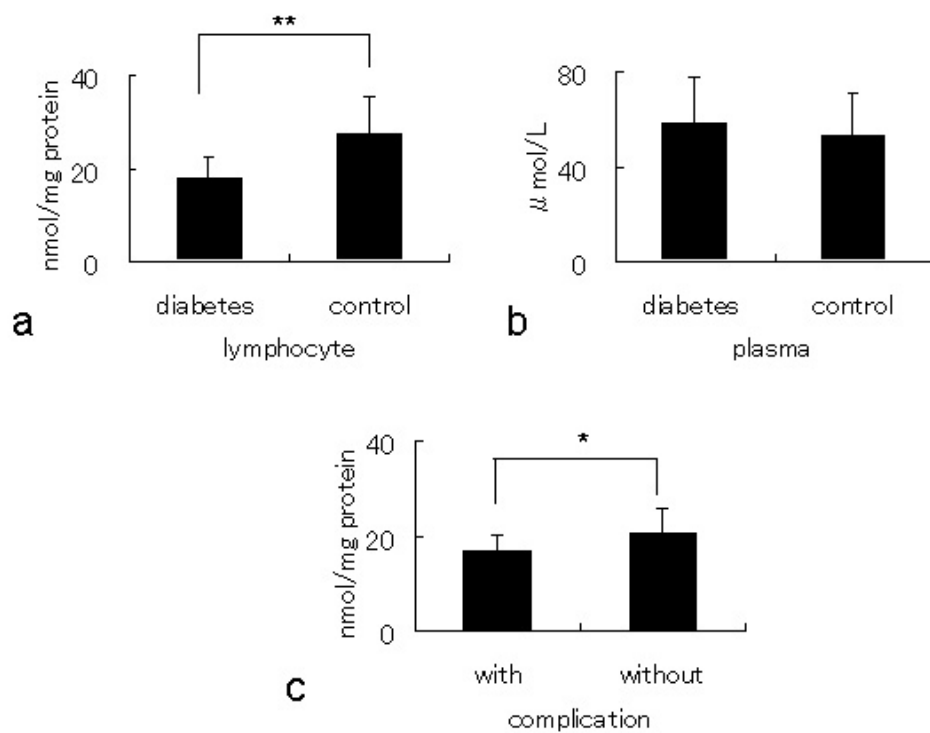


図 3. II 型糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミン C 濃度

- a: リンパ球のビタミン C 濃度, b: 血漿ビタミン C 濃度,
c: リンパ球ビタミン C 濃度 (合併症の有無)

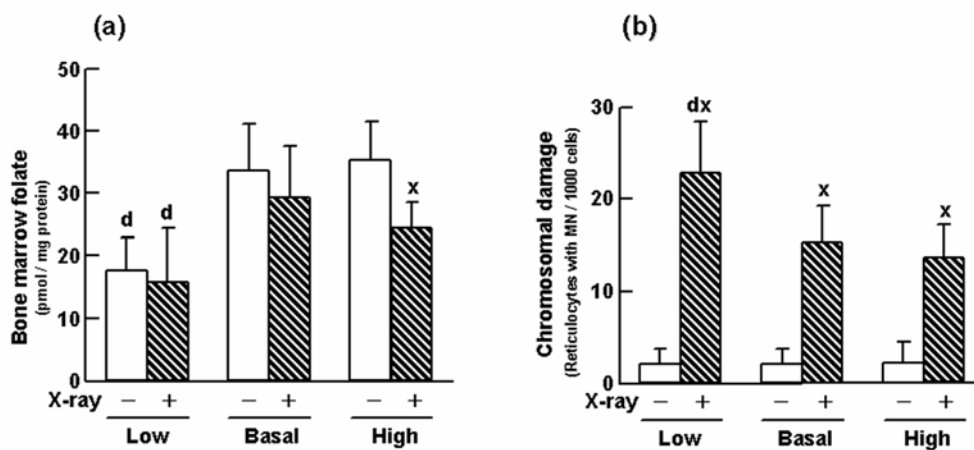


図 4. 種々の葉酸含量の飼料を 4 週間摂取させたマウスに X 線を照射したあとの骨髓中の葉酸濃度と染色体損傷 (動物実験)

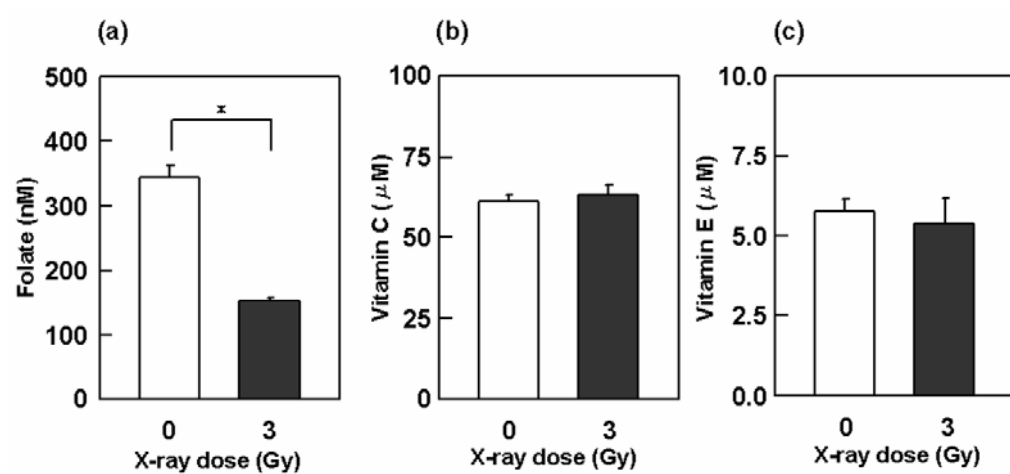


図5. マウス血漿に *in vitro* で X 線照射した場合の葉酸 (a) , ビタミン C (b) および ビタミン E (c) 濃度の変化