

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）  
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究  
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

## Ⅱ．主任研究者の報告

### 1．ヒト血清中の葉酸値とビタミン B<sub>12</sub> 含量の男女差に関する研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

血清中の葉酸値とビタミン B<sub>12</sub> 値に関して、我々が以前に行った実験では、男女差が認められた。ビタミン摂取量は同じであるにも関わらず、男性の方が有意に低い値を示した。男子学生（約 20 歳）は 8 月に実験を行い、女子学生（約 20 歳）は 3 月に行った。葉酸とビタミン B<sub>12</sub> は光に対して不安定な化合物である。8 月の被験者は、太陽の強い午後 2 時頃屋外で運動させたことが一因でもある可能性がある。今回は、食事制限をせずに、観察疫学的に、健常な男女学生を集め、昼食前の血液を採取し、血清中の葉酸値とビタミン B<sub>12</sub> 値を測定し、比較した。血液採取日は平成 16 年 11 月 25 日である。その結果、男子学生の血清葉酸値は  $15.0 \pm 5.8$  pmol/mL（平均値 $\pm$ SD, n=24）、女子学生は  $18.0 \pm 6.0$  pmol/mL（平均値 $\pm$ SD, n=33）であり、今回、有意差は認められなかった。ビタミン B<sub>12</sub> 値は  $0.30 \pm 0.08$  pmol/mL（平均値 $\pm$ SD, n=24）、女子学生は  $0.38 \pm 0.11$  pmol/mL（平均値 $\pm$ SD, n=33）であった。女子学生の方が有意に高い値を示した。今回は、食事調査を行っていないので、血液提供者の葉酸とビタミン B<sub>12</sub> 摂取量の差異は不明であるが、今回の報告と、従来 of 報告を考え合わせると、血清葉酸値は、男性の方が低い傾向が認められることもあるが、必要量を算定する場合に、この点を考慮するか否かにについては、男性被験者を使用した冬の介入試験を行った後にしたい。さらに、必要量に季節変動があるか否かについても検討したい。

## A. 目的

今までに、男女学生を被験者としたビタミン必要量に関する介入実験を2回行った(1,2)。その結果、血清中の葉酸含量と血清中のビタミン B<sub>12</sub> 含量において、男女差が認められた。平成14年3月1日～3月8日に行われた女子学生を被験者(10名)とする実験では、血清中の葉酸含量は、 $30.2 \pm 8.6$  pmol/mL (平均値 $\pm$ SD)であった。一方、平成14年8月27日～9月3日に行われた男子学生を被験者(10名)とする実験では $15.6 \pm 4.6$  pmol/mLであり、有意な差異が認められた。血清ビタミン B<sub>12</sub> 含量においても、女子学生が $0.67 \pm 0.20$  pmol/mL、男子学生が $0.34 \pm 0.05$  pmol/mLで有意な差異が認められた。

葉酸もビタミン B<sub>12</sub> も光に対して不安定であることから、血液採取後は、光に対して十分配慮をおこなって操作を行ったが、葉酸は血管中でUVAを浴びることで破壊される危険性があるという(3,4)。つまり、夏のような強い光の下でいると、血液中の葉酸が破壊される危険性がある、という情報である。この点を考慮すると、夏に行った実験では被験者がランニング、短パンという姿で、太陽を一杯浴びていたことが気になってきた。

そこで、今回、冬に向かう11月25日に男女学生の血清中の葉酸含量を測定し、比較した。同時に男女差が認められたビタミン B<sub>12</sub> 含量についても比較した。

## B. 実験方法

### 1. 被験者

今回の実験の趣旨を理解し、問診票に答えてくれた学生のうち、我々が健常と判断

した学生について、本人の同意を得た。そして、ビタミン剤摂取が少なくとも1週間以上ないことを再度口頭で確認後、昼食前の午後12時～13時にかけて採血を行った。

被験者の男性(24名)の年齢の平均値 $\pm$ SDは $22 \pm 1.4$ 歳、身長は $173 \pm 6$  cm、体重は $65.9 \pm 9.81$  kg、BMIは $21.9 \pm 2.5$ であった。女性(33名)の年齢の平均値 $\pm$ SDは $21 \pm 2.6$ 歳、身長は $158 \pm 6$  cm、体重は $50.9 \pm 5.87$  kg、BMIは $20.3 \pm 1.9$ であった。

### 2. 葉酸の測定方法

分析は、三菱BCLに依頼した。その方法は、CLIA法(chemiluminescence immunoassay)である。簡単に説明すると、血清試料に水酸化ナトリウム溶液とジチオスレイトールを加え、血清中で葉酸と結合しているタンパク質を変性させて、葉酸をすべて遊離状態とする。次に、磁性鉄微粒子でコーティングした牛乳由来の葉酸結合タンパク質とアクリジニウムエステル標識葉酸(プテロイルモノグルタミン酸)を加え、磁性鉄微粒子に結合している葉酸結合タンパク質に対し、競合的に反応させる。磁性鉄微粒子でコーティングした牛乳由来の葉酸結合タンパク質に結合した血清中の葉酸とアクリジニウムエステル標識葉酸(プテロイルモノグルタミン酸)と結合タンパク質に結合していないアクリジニウムエステル標識葉酸(プテロイルモノグルタミン酸)の分離は、磁力を用いて行い、上清を除去した。次に酸化剤として過酸化水素および硝酸、酸化補助剤として水酸化ナトリウムを加えると、アクリジニウムエステルは酸化され、結合開裂を生じ、励起状態の中間体を形成する。この中間体が基底状態に戻る時に発光するので、その光子量

を計測し、検量線より葉酸の含量を測定するものである。

### 3. ビタミン B<sub>12</sub> の測定方法

分析は、三菱 BCL に依頼した。その方法は、CLIA 法 (chemiluminescence immunoassay) である。簡単に説明すると、血清試料に水酸化ナトリウム溶液とジチオスレイトールを加え、血清中でビタミン B<sub>12</sub> と結合しているタンパク質を変性させて、ビタミン B<sub>12</sub> をすべて遊離状態とする。次に、磁性鉄微粒子でコーティングした精製豚内因子とアクリジニウムエステルビタミン B<sub>12</sub> (シアノコバラミン) を加え、磁性鉄微粒子に結合しているビタミン B<sub>12</sub> 内因子に対し、競合的に反応させる。磁性鉄微粒子でコーティングした精製豚内因子に結合した血清中のビタミン B<sub>12</sub> とアクリジニウムエステル標識ビタミン B<sub>12</sub> と内因子に結合していないアクリジニウムエステル標識ビタミン B<sub>12</sub> の分離は、磁力を用いて行い、上清を除去した。次に酸化剤として過酸化水素および硝酸、酸化補助剤として水酸化ナトリウムを加えると、アクリジニウムエステルは酸化され、結合開裂を生じ、励起状態の中間体を形成する。この中間体が基底状態に戻る時に発光するので、その光子量を計測し、検量線よりビタミン B<sub>12</sub> の含量を測定するものである。

### 4. 統計処理

結果はすべて平均値±標準偏差 (SD) であらわし、Student の *t*-test により危険率 5% にて有意性を判定した。

## C. 結果

### 1. 血清中の葉酸含量

図 1 に示したように、血清葉酸含量は男

子学生で、 $15.0 \pm 5.8$  pmol/mL (平均値±SD,  $n=24$ ), 女子学生で  $18.0 \pm 6.0$  pmol/mL (平均値±SD,  $n=33$ ) であった。有意差は認められなかった。

### 2. 血清ビタミン B<sub>12</sub> 含量

図 2 に示したように、男子学生のビタミン B<sub>12</sub> 値は  $0.30 \pm 0.08$  pmol/mL (平均値±SD,  $n=24$ ), 女子学生は  $0.38 \pm 0.11$  pmol/mL (平均値±SD,  $n=33$ ) であった。有意差は認められ、女子学生の方が有意に高い値を示した。

## D. 考察

血清中の葉酸値とビタミン B<sub>12</sub> 値に関して、我々が行った実験 (1,2) では、男女差が認められた。男子学生 (約 20 歳) は 8 月に実験を行い、女子学生 (約 20 歳) は 3 月に行った。葉酸とビタミン B<sub>12</sub> は光に対して不安定な化合物である。8 月の被験者は、太陽の強い午後 2 時頃屋外で運動させたことが一因でもある可能性がある (3)。今回は、食事制限をせずに、観察疫学的に、健常な男女学生を集め、昼食前の血液を採取し、血清中の葉酸含量とビタミン B<sub>12</sub> 含量を測定し、比較したものである。血液採取日は平成 16 年 11 月 25 日である。その結果、男子学生の血清葉酸含量は  $15.0 \pm 5.8$  pmol/mL (平均値±SD,  $n=24$ ), 女子学生は  $18.0 \pm 6.0$  pmol/mL (平均値±SD,  $n=33$ ) であった。有意差は認められなかった。

前回行った食事制限を行った介入試験 (1) では、葉酸をプテロイルモノグルタミン酸として 200μg/日摂取させた。食事性葉酸としては 340μg (遊離型、すなわちサプリメント型の葉酸は食事性葉酸の 1.7 倍の生体利用率を有するため) (5) に相当する量である。その時の値は、男子学生が  $15.6 \pm 4.6$

pmol/mL, 女子学生が  $30.2 \pm 8.6$  pmol/mL であった(1,2). この前回の値と比較すると, 男子学生はともに, 15 pmol/mL 程度で同じ値であったが, 女子学生においては, 今回のように通常の食事を摂取しているときの値は, 前回の値の約 30 pmol/mL の約半分の 18 pmol/mL であった. ちなみに, 今回の食事摂取基準(2005 年版)においては, 血清葉酸含量が 7 pmol/mL 以上, 赤血球葉酸含量が 300 pmol/mL 以上, 血清ホモシステイン含量が 14 nmol/mL 未満に 50% の人が維持できる食事性葉酸の摂取量を  $200 \mu\text{g}/\text{日}$  としている(6). すなわち, 推定平均必要量を  $200 \mu\text{g}/\text{日}$  と策定している. 今回の男子学生において, 血清中の葉酸含量が 7 pmol/mL 未満の数は 1 名であり, その値は 5.7 pmol/mL であった. 女子学生は, 全員が 7 pmol/mL 以上の値であった.

今回のビタミン B<sub>12</sub> 含量は, 男子学生が  $0.30 \pm 0.08$  pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=24), 女子学生が  $0.38 \pm 0.11$  pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=33) であった. 女子学生の方が有意に高い値を示した. 前回の介入試験(1,2)では, シアノコバラミンとして  $2.4 \mu\text{g}/\text{日}$  を摂取させ, その値が男子学生では 0.34 pmol/mL, 女子学生では 0.67 pmol/mL であった. 男子学生では, 今回の値と前回の値は有意な差異が認められなかったが, 女子学生においては, 今回の方が有意に低い値であった.

血清葉酸含量とビタミン B<sub>12</sub> 含量が, 男子の方が女子よりも低いことは, 韓国人においても報告されている(7). 韓国人の値は, 血清葉酸は, 男子が  $14.7 \pm 6.9$  pmol/mL, 女子が  $18.0 \pm 8.0$  pmol/mL である. 血清ビタミン B<sub>12</sub> 含量は, 男子で  $0.40 \pm 0.16$  pmol/mL, 女子で  $0.49 \pm 0.23$  pmol/mL である.

高齢者においても, 女子の方(16.3 pmol/mL)が男子(12.7 pmol/mL)よりも血清葉酸値が高いことが報告されている(8). 血清中のビタミン B<sub>12</sub> 含量においても, 女子の方(0.60 pmol/mL)が男子(0.48 pmol/mL)よりも高い値を示すことが報告されている(9).

前回の介入試験の時の血清葉酸含量と血清ビタミン B<sub>12</sub> 含量と比較して, 今回の観察疫学的な値と比較すると, 男子学生においては, 葉酸もビタミン B<sub>12</sub> もほぼ同じ値であった. 一方, 女子学生においては, 血清葉酸含量もビタミン B<sub>12</sub> 含量も, 前回の半分程度であった. この原因については, 不明である.

E. 健康危機情報  
特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文  
なし
2. 学会発表  
なし

G 知的財産権の出願・登録状況

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. 厚生労働科学研究費補助金, 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, 平成 14 年度 総括・分担研究報告書, 主任研究者 柴田克己, 平成 15(2003)年 4 月.
2. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N. Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. J. Nutr. Sci. Vitaminol., under contribution.
  3. Branda RF, Eaton JW. (1978) Skin color and nutrient photolysis: an evolutionary hypothesis. Science, 201:625-626.
  4. Gambichler T, Bader A, Sauermann K, Altmeyer P, and Hoffmann K. (2001) Serum folate levels after UVA exposure: a two-group parallel randomized controlled trial. BMC Dermatol., 1:8 (<http://www.biomedcentral.com/1471-5945/1/8>).
  5. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF 3<sup>rd</sup>. (1997) Absorption of folate from fortified cereal-grain products and supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. Am J Clin Nutr, 66:1388-1397.
  6. 厚生労働省, 日本人の食事摂取基準 (2005 年版), 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書, 2004 年 10 月.
  7. Kim H-S, Heo Y-R. (2002). Plasma total homocysteine, folate, and vitamin B<sub>12</sub>, status in Korean adults. J Nutr Sci Vitaminol, 48:290-297.
  8. Tucker KL, Selhub J, Wilson PW, Rosenberg IH (1996) Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham Heart Study. J Nutr, 126:3025-2031.
  9. Fernandes-Costa F, van Tonder S, Metz J (1985) A sex difference in serum cobalamin and transcobalamin levels. Am J Clin Nutr, 41:784-786.

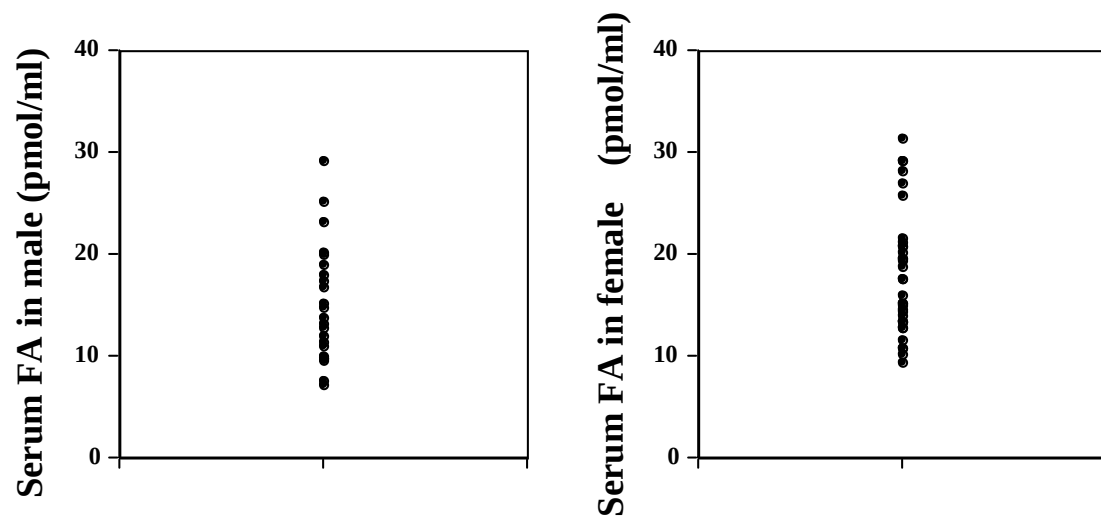


図 1. 通常食摂取時の男女学生の血清葉酸含量

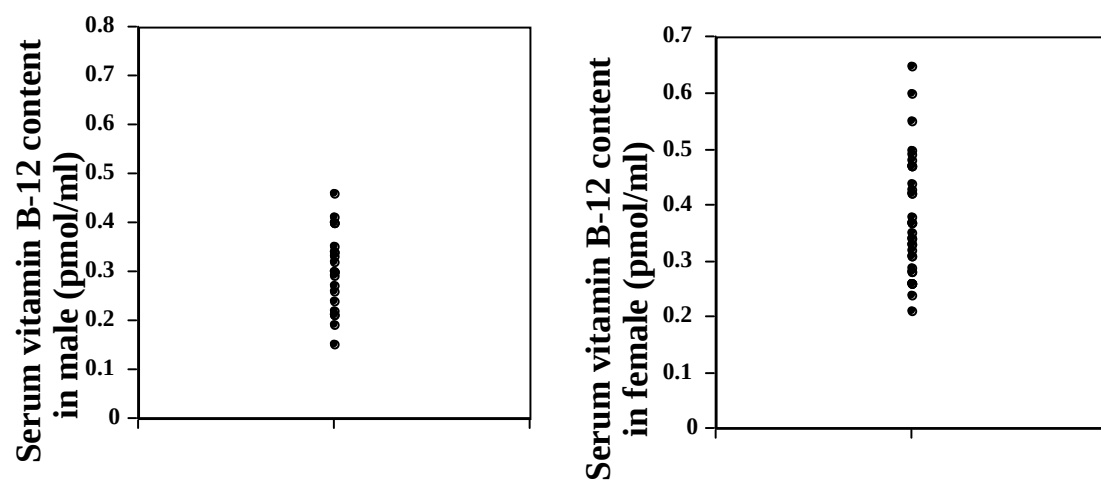


図 2. 通常食摂取時の男女学生の血清ビタミン B<sub>12</sub> 含量