

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

2. ヒト全血中のビタミン B₁, ビタミン B₂ 及び NAD 含量, 並びに血清ビタミン C 含量に関する研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

男女学生の全血中のビタミン B₁, ビタミン B₂ 及び NAD 含量を測定した. その結果, 次の値が得られた.

	男子学生 (平均値±SD, n = 24)	女子学生 ((平均値±SD, n = 33)
年齢	22±1.4	21±2.6
身長 (cm)	173±6	158±6
体重 (kg)	65.9±9.8	50.9±5.9
BMI	21.9±2.5	20.3±1.9
B ₁ (pmol/mL)	99±25	101±25
B ₂ (pmol/mL)	129±1.4	137±39
NAD (nmol/mL)	30±5	31±5

男女学生の血清ビタミン C, 葉酸, ビタミン B₁₂ 含量を以下に示した.

	男子学生 (平均値±SD, n = 24)	女子学生 ((平均値±SD, n = 33)
C (nmol/mL)	40±16	54±14
葉酸 (pmol/mL)	15.0±5.8	18.0±6.0
B ₁₂ (pmol/mL)	0.30±0.08	0.38±0.11

なお, 葉酸とビタミン B₁₂ に関しては, この前頁の報告に記載済みである.

A. 目的

代謝が最も盛んな時期である、若年成人の血液中の水溶性ビタミンの値を知るために行った。前回 (1,2), 第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準—に従った栄養素組成をまねた半合成食を投与した時の男女学生の血液中の水溶性ビタミン含量について報告したので、今回は、自由に食事を摂取させた時の値を求めた。

B. 実験方法

1. 被験者

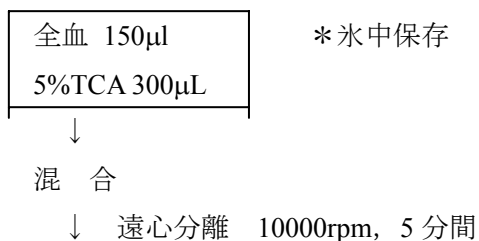
今回の実験の趣旨を理解し、問診票に答えてくれた学生のうち、我々が健常と判断した学生について、本人の同意を得た。そして、ビタミン剤摂取が少なくとも 1 週間以上ないことを再度口頭で確認後、昼食前の午後 12 時～13 時にかけて採血を行った。

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

2. ビタミン B₁ の測定方法

基本的には、木村ら(3)が開発したポストカラム法を改良した柴田法 (4) で行った。操作の概略を以下に示した。

全血中からの総ビタミン B₁ の抽出操作を示す。この抽出操作では、TDP, TMP, チアミンが抽出される。



上 清

↓ 0.45 μ m のフィルターでろ過

HPLC 注入用試料

50 μ l 注入

【測定条件】

移動相 : 0.2M NaH₂PO₄
反応液 : ①0.01% K₃Fe(CN)₆
 流速 0.15ml/min
 ②15% NaOH
 流速 0.15ml/min
カラム : Shodex Rs-pak NN-614
 (ϕ 6.0 $\times$ 150mm)
カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
検出器 : RF-550 SHIMAZU
検出方法 : 蛍光法
(励起波長 365nm、蛍光波長 435nm)

【試薬作成方法】

0.1M HCl

Hydrochloric Acid = 36.46
(和光純薬工業株式会社、常温保存)

[Assay 35.0 ~ 37.0%, 比重 1.18]
 $1180 \times 36 / 100 = 424.8$ (g) $\cdots$ 1L に含まれる塩酸量

$424.8 / 36.5 = 11.6$ mol / L $\cdots$ 1L に含まれる塩酸のモル濃度

HCl を 1ml 取り、超純水を 115ml 加えてよく混和した。

ビタミン B₁ 標準 (冷蔵保存)

Thiamin Hydrochloride = 337.27 (和光純薬工業株式会社、常温保存)

1. C₁₂H₁₇ClN₄OS $\cdot$ HCl を 10 mg 秤量し、0.1MHCl 10 ml に溶解した。(1 mg/ml V.B₁)
2. 1. を 0.1 ml 取り 0.1M HCl 9.9 ml 加えて 100 倍希釈し、よく混和した。
3. 0.1 M HCl を対照として、2. の吸光度を測

定し、OD_{246nm}=14200 より正確な濃度を求め、これを標準液とした。

移動相

0.2M NaH₂PO₄

Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate = 156.01

$$156.01 \times 0.2 \times 1 = 31.202 \text{ g}$$

(和光純薬工業株式会社、室温保存)

NaH₂PO₄·2H₂O を 31.202 g 秤量し、超純水 800ml くらいに溶解して、1L にメスアップし、よく混合した。これを 2 度繰り返し、2 L 作成した。

反応液

0.01% K₃ [Fe(CN)₆]

Potassium Hexacyanoferrate(III)

K₃ [Fe(CN)₆] = 329.25 (和光純薬工業株式会社、室温保存)

$$500 \times 0.01/100 = 0.05 \text{ g}$$

K₃ [Fe(CN)₆] を 0.05 g 秤量して、500 ml に溶解してよく混合した。

15% NaOH

NaOH = 40.00 (Assay min.96.0%)

(和光純薬工業株式会社、室温保存)

$$500 \times 15/100 = 75.0 \text{ g}$$

NaOH を 75 g 秤量してビーカーに入れ、ガラス棒でよく混和しながら、425 ml の超純水を少しずつ加えて溶解した。(このとき刺激臭と熱を発するので、ドラフト内で氷水で冷やしながらかけた。)

【計算方法】

1. 標準を流し、1pmol 当たりの面積を計算した。

[1pmol 当たりの AREA→5000 前後]

$$2. \text{ AREA}/(1\text{pmol 当たりの面積}) \times 300\mu\text{l}/50\mu\text{l} \times 1000\mu\text{l}/150\mu\text{l} = \text{ } \mu\text{mol}/\text{全血 } 1\text{ml}$$

※ 300μl・・・血液 150μl + 5% TCA300μl の上清量
50μl・・・インジェクション量
1000/150 μl・・・血液 1ml に換算

【試薬作成方法】

5%TCA 溶液

Trichloroacetic Acid=163.39 (和光純薬工業株式会社、室温保存)

TCA 10.0g を秤量し、超純水を 160ml 加えて溶解して、200ml にメスアップした。

TDP 標準溶液

Thiamin pyrophosphate chloride=460.8

1. $5 \times 10^{-3}\text{M}$ TDP 作成

TDP を 0.0230g 秤量し、5%TCA10ml に溶解した。

2. $5 \times 10^{-4}\text{M}$ TDP 作成

1.を 0.1ml 取り、5%TCA0.9ml 加えて 10 倍希釈し、よく混合した。

3. $5 \times 10^{-6}\text{M}$ TDP 作成

2.を 0.1ml 取り、5%TCA9.9ml 加えて 100 倍希釈し、よく混合した。

4. $5 \times 10^{-7}\text{M}$ TDP 作成

3.を 0.1ml 取り、5%TCA0.9ml 加えて 10 倍希釈し、よく混合した。

これを標準溶液として用いた。

TMP 標準溶液

Thiamin monophosphate chloride=416.8

1. $5 \times 10^{-3}\text{M}$ TMP 作成

TMP を 0.0208g 秤量し、5%TCA10ml

に溶解した.

2. 5×10^{-4} M TMP 作成

1. を 0.1ml 取り, 5%TCA 0.9ml 加えて 10 倍希釈し, よく混合した.

3. 5×10^{-6} M TMP 作成

2. を 0.1ml 取り, 5%TCA 9.9ml 加えて 100 倍希釈し, よく混合した.

4. 5×10^{-7} M TMP 作成

3. を 0.1ml 取り, 5%TCA 0.9ml 加えて 10 倍希釈し, よく混合した.

これを標準溶液として用いた.

Thiamin 標準溶液

Thiamin Hydrochloride=337.27

1. 5×10^{-3} M Thiamin 作成

Thiamin を 0.0169g 秤量し, 5%TCA 10ml に溶解した.

2. 5×10^{-4} M Thiamin 作成

1. を 0.1ml 取り, 5%TCA 0.9ml 加えて 10 倍希釈し, よく混合した.

3. 5×10^{-6} M Thiamin 作成

2. を 0.1ml 取り, 5%TCA 9.9ml 加えて 100 倍希釈し, よく混合した.

4. 5×10^{-7} M Thiamin 作成

3. を 0.1ml 取り, 5%TCA 0.9ml 加えて 10 倍希釈し, よく混合した.

これを標準溶液として用いた.

2. ビタミン B₂ の測定方法

全血中ビタミン B₂ (Riboflavin, FMN, FAD) 量測定方法

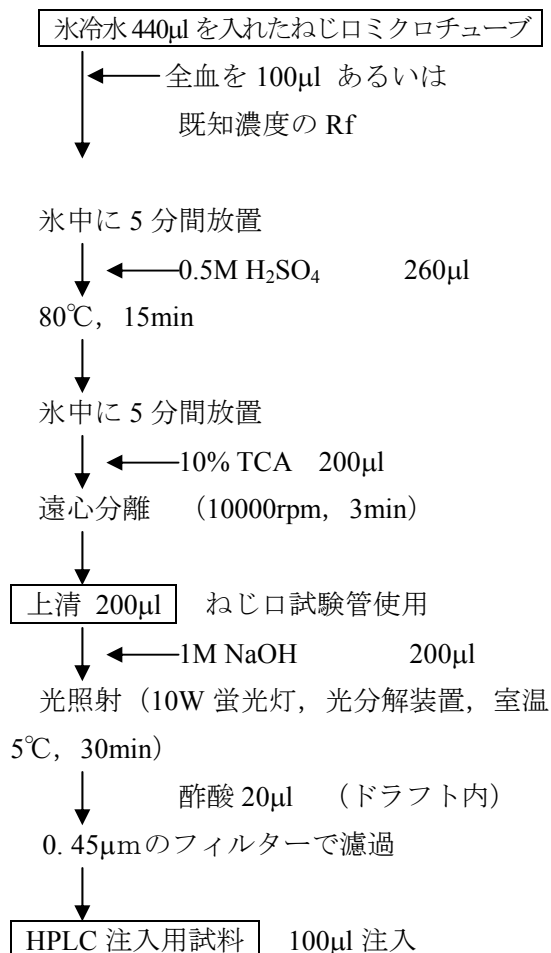
大川ら (5) が開発したルミフラビン-HPLC 法にて測定を行った.

【サンプル前処理】

1. ねじロマイクロチューブ (2ml) に水 440μl を入れ, 氷冷した.

2. 血液 100μl 採血後, 直ちに 1. に加え, タッチミキサーで攪拌した.

【サンプル作成】



※光照射することで, 試料中の Riboflavin, FMN, FAD を Lumiflavin に分解し, 総ビタミン B₂ とするものであるが, Riboflavin, FMN, FAD は 100% Lumiflavin に転換されるわけではない. そこで, 転換率を求めるために, 既知濃度の Riboflavin 標準液を試料として上記の操作を同時に行った.

【測定条件】

移動相: 1M NaH₂PO₄ (pH5.5) 6.5ml
Methanol 350ml

超純水 643.5ml
 流速： 0.8ml/min
 カラム： Tosoh ODS-80TS
 (φ 4.6×250mm)
 カラム温度： 40℃
 検出器： SHIMADZU RF-10AXL
 検出方法： 蛍光法（励起波長 445nm,
 蛍光波長 530nm）
 Auto injector： stop time 20min
 データプロセッサー： stop time 19min
 Lumiflavin 1pmol 当たりの AREA： 13,000
 Riboflavin から Lumiflavin への転換率： 75%
 前後

【計算方法】

- 1) Lumiflavin 標準 1pmol 当たりの AREA・・・a
- 2) Riboflavin から Lumiflavin への転換率
 転換率：試料液全量 1000μl, そこに含まれる試料 100μl. 100/1000
 光照射に用いる液量 200μl
 光照射された試料の全量 420μl,
 HPLC 注入量 100μl. 100/420

$$100/1000 \times 200 \times 100/420 = 4.76\mu\text{l}$$
 正確な濃度を求めた Riboflavin 標準 4.76μl 中に含まれるモル数を求めた・・・b
 (既知濃度の Riboflavin 検出 AREA)/ a × 1 / b × 100 = c %
 3) (検出 AREA) / a × 1000μl / 4.76μl[※] × 100 / c = __ pmol/ml
 ※ 4.76μl = 注入量 100μl 中に含まれる試料の量

【試料の調整方法】

Lumiflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

Lumiflavin = 256.3 (SIGMA)

1. Lumiflavin を 0.0010g 秤量し, 超純水

10ml に溶解させた. (100μg/ml)

2. 1 を 500μl とり, 超純水 9.5ml 加えて, 20 倍希釈した. (10μg/ml)
3. 2 の吸光度を測定し, ϵ 441.0 = 10,900 より正確な濃度を求めた.
4. 3 を 20μl とり, 1180μl の超純水を加えて 60 倍希釈し, 標準とした.

Riboflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

Riboflavin = 376.36 (和光純薬工業株式会社, 一級試薬)

1. Riboflavin を 0.010g 秤量し, 0.1M KPB (pH7.0) 10ml を加え, 懸濁液を均一化した.
2. 1 を 100μl とり, 0.1M KPB (pH7.0) 9.9ml に溶解させた.
3. 2 の吸光度を測定し, ϵ 445.0 = 12,500 より正確な濃度を求めた.
4. 3 を 200μl に 0.1M KPB (pH7.0) 200μl 加え使用した.
5. 4 を 100μl に 0.1M KPB (pH7.0) 400μl 加えし使用した.

0.5M H₂PO₄ (冷蔵保存)

Sulfuric Acid 96.0~98.0% 18M (和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

超純水 972.2ml に硫酸 27.8ml を加え, 氷で冷やしながら溶解させた.

10%TCA (室温保存)

Trichloroacetic Acid = 163.39 (和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

TCA を 20g 秤量し, 超純水 180ml で溶解させた.

1M NaOH (冷蔵保存)

Sodium Hydrogenphosphate = 40.00 (和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

$$40.00 \times 0.1 \times 1 = 4.0$$

NaOH を 4.0g 秤量し, ドラフト内で水令しながら (熱と臭気を発するため) 80ml の超純水に溶解させ, 100ml に定容した.

酢酸

和光純薬工業株式会社, 特級試薬をそのまま使用

3. NAD の測定方法

柴田ら(6)が開発した酵素サイクリング法を用いた.

4. ビタミン C の測定方法

ビタミン C を酸化型アスコルビン酸 {DHA+DKG} に変換し, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を反応させて生成するオサゾン (デヒドロアスコルビン酸ビス-ジニトロフェニルヒドラゾン) を HPLC で特異的に定量した(7).

C. 結果

1. 全血中の総ビタミン B₁ 含量

図 1 に示したように, 全血ビタミン B₁ 含量は男子学生で, 99 ± 25 pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=24), 女子学生で 101 ± 25 pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=33) であった. 有意差は認められなかった.

2. 全血中の総ビタミン B₂ 含量

図 2 に示したように, 男子学生のビタミン B₂ 値は 129 ± 35 pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=24), 女子学生は 137 ± 39 pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=33) であった. 有意差は認められなかった.

3. 全血中の NAD 含量

図 3 に示したように, 男子学生の NAD 値

は 30 ± 5 pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=24), 女子学生は 31 ± 5 pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=33) であった. 有意差は認められなかった.

4. 血清中のビタミン C 含量

図 4 に示したように, 血清ビタミン C 含量は男子学生で, 40 ± 17 pmol/mL (平均値 $\pm$ SD, n=24), 女子学生で 54 ± 14 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であった.

D. 考察

全血中のビタミン B₁ 値に関しては, 普通食摂取時の日本人のデータが報告されており, 中年男性で 119 ± 33 pmol/mL (n = 524), 中年女性で 104 ± 27 pmol/mL (n = 345) と報告されている(8). 前回の介入試験においても, 男子学生が 104 ± 17 pmol/mL, 女子学生が 90 ± 23 pmol/mL であり(1,2), 今回の値とほぼ同じであった. つまり, 血液中のビタミン B₁ 値は男女差もなく, 年齢による差異 (中年と若年成人) もないことが明らかとなった.

日本人の全血中のビタミン B₂ 含量に関しては, 平岡が(9)報告した女子学生においては 225 pmol/mL とされている. 前回の報告(1,2)においても, 全血中のビタミン B₂ 含量は男子学生で 216 ± 25 pmol/mL, 女子学生で 234 ± 18 pmol/mL であった. ところが, 今回は, これらの値の半分の 130 pmol/mL 程度であった. いずれの結果においても, 男女差は認められなかったが, 今回の値が平岡(9)と前回(1,2)の値の半分であった原因については不明である.

日本人の全血中の NAD 含量に関する報告はすでに, 我々のものが数多くある. いずれの値も 30 nmol/mL 程度である(10). 今

回の値も、男女ともに 30 nmol/mL 程度であり、男女差は認められなかった。

血清中のビタミン C 含量を測定した。血清中のビタミン C 含量に関しては、Levine らは(11)、 62 ± 10 nmol/mL ($n = 15$, 女性)と報告している。Kobata らは(12)、7 人の女性に 111mg のビタミン C を投与した時の血清ビタミン C 含量は 57 ± 11 nmol/mL であったと報告している。今回は自由に摂取させた時の血清ビタミン C 含量であるが、男子学生が 40 ± 17 nmol/mL、女子学生が 54 ± 14 nmol/mL であった。男子学生の血清ビタミン C 含量が女子学生よりも有意に低い値を示したが、原因は不明である。

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. Kimura M, Fujita T, Itokawa Y. (1982) Liquid chromatographic determination of the total thiamin content of blood. Clin Chem, 28:29-31.
4. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己 (2004) 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファン→ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位. 食品衛生学雑誌, 45:231-238.
5. Ohkawa H, Ohishi N, Yaagi K. (1982) A simple method for micro-determination of flavin in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. Biochem Int, 4:187-194.
6. Shibata K, Murata K. (1986) Blood NAD as an index of niacin nutrition. Nutr Int, 2:177-181.
7. Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S. (1992) Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography.

Anal Chem, 64:1501-1507.

8. Takeda A, Suyama T, Suzuki T, Imanishi M, Takeda R, Kitamura R, Tamai H, Kimura M. (2002) Vitamin B₁ nutritional status assessed by blood vitamin B₁ value of middle aged Japanese men and Women . Vitamins, 76:349-353.
9. Hiraoka M. (2001) Nutritional status of vitamin A, E, C, B₁, B₂, B₆, nicotinic acid, B₁₂, folate, and β -carotene in young women. J Nutr Sci Vitaminol, 47:20-27.
10. Shibata K. (1987) Blood pyridine nucleotide levels reflect niacin equivalent intake in humans. J Clin Biochem Nutr, 3:493-499.
11. Levine E, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. (2001) A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. Proc Natl Acad Sci, USA, 98:9842-9846.
12. Kobata T, Inoue K, Ishii K, Higuchi M. (1998) Vitamin status in young women with different physical activity level. Vitamins, 72:363-371.

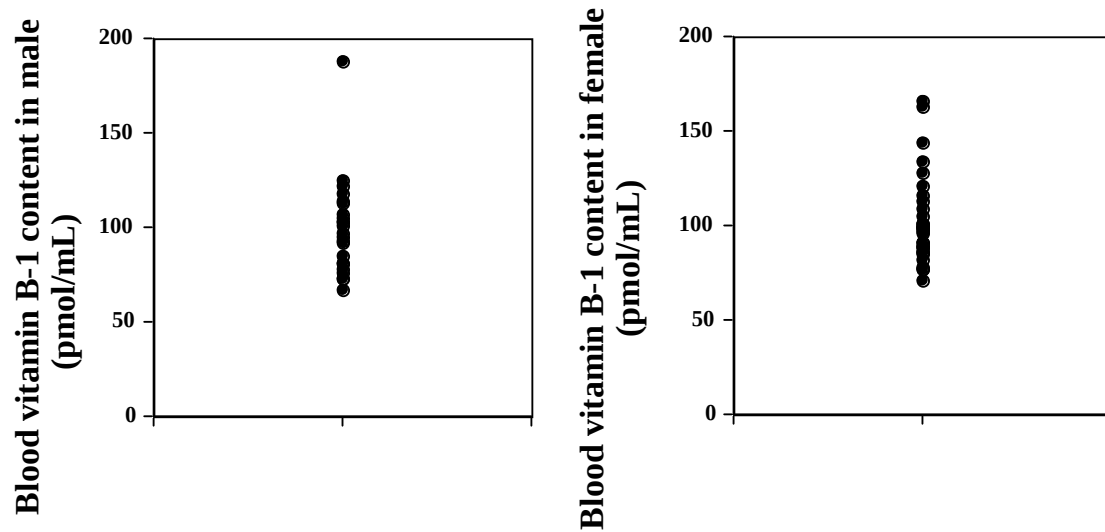


図 1. 自由食摂取時の全血中のビタミン B₁ 含量

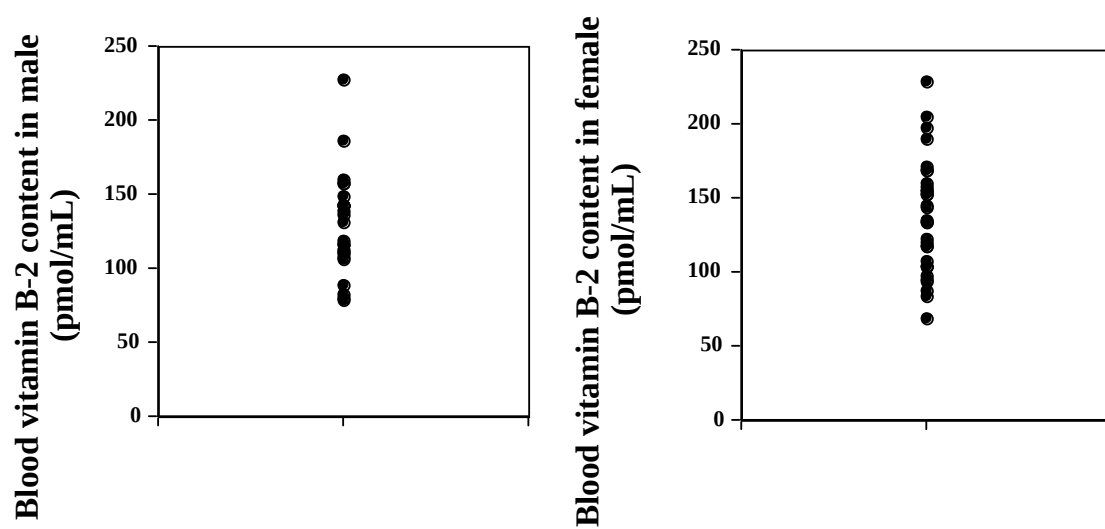


図 2. 自由食摂取時の全血中のビタミン B₂ 含量

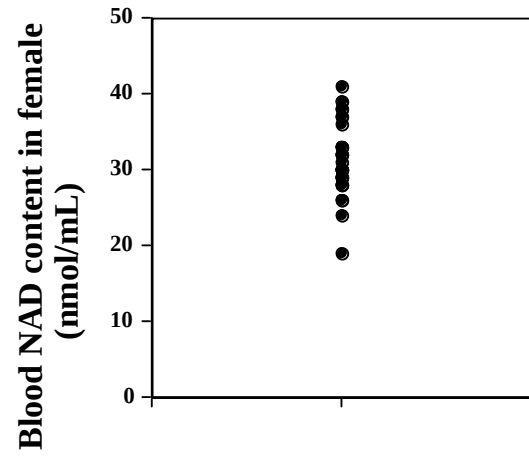
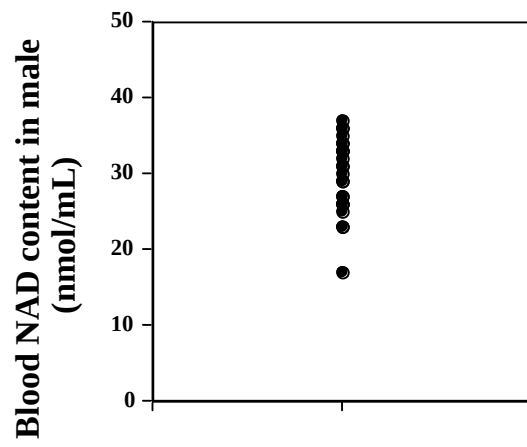


図 3. 自由食摂取時の全血中の NAD 含量

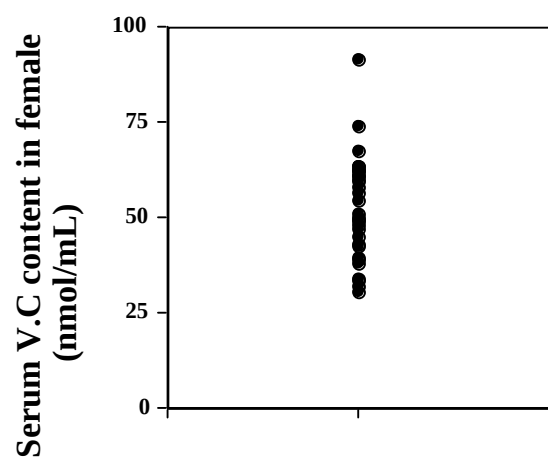
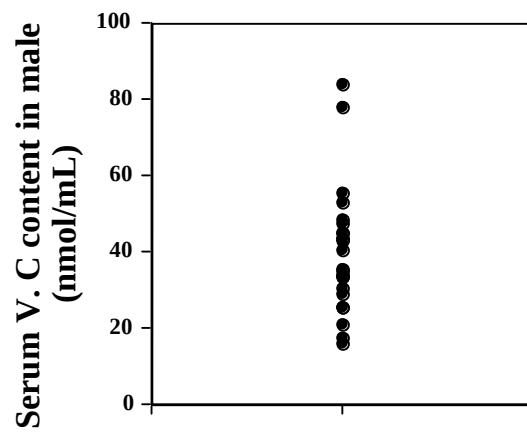


図 4. 自由食摂取時の血清ビタミン C 含量