

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

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

#### 10. ビタミンCと葉酸の必要量に関する検討 -ビタミンC, 葉酸-

分担研究者 梅垣敬三 独立行政法人国立健康・栄養研究所 室長

##### 研究要旨

ビタミンの必要量ならびに上限摂取量の策定には、ビタミンの信頼できる分析方法の開発、摂取量を反映する適切な生体指標の選定が要求される。本研究ではビタミンCの分析方法として、高感度かつ迅速に測定できる電気化学検出（ECD）-HPLC法の適用の可能性を検討した。その結果、食品ならびに生体試料のいずれにおいても、電気化学検出-HPLC法が、従来のヒドラジン-UV-HPLC法よりもビタミンC分析に適した方法であるという結果を得た。一方、ビタミンCの生体指標としては、白血球ビタミンC濃度が不足状態を示すよい指標になると考えられている。酸化ストレスが高いと考えられる糖尿病患者のビタミンC濃度をリンパ球と血漿で比較したところ、糖尿病患者では血漿ビタミンC濃度は低下しないが、リンパ球ビタミンC濃度は低下していた。一方、健常人においてビタミンCの摂取量と血漿やリンパ球濃度の関係を考えると、リンパ球中の濃度は推奨量で飽和してしまうため、かなりの不足や病的な状況以外は食事からの摂取量を敏感に反映しない可能性がある。以上の結果から、体内ビタミンCレベルの評価指標としては、評価対象者の状態に応じて血漿とリンパ球の両方を用いることが適切であると考えられた。葉酸については、食品中に存在する多様な形態の葉酸を分析できる微生物学的分析方法の条件設定を行った。

## A. 研究目的

ビタミンの食事からの摂取量と体内レベルを把握することは食事摂取基準策定において重要である。そのためには食品ならびに生体試料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。ビタミン C は種々の食材ならびに加工食品に含まれており、最近では過剰摂取の傾向になっているとも考えられる。そのため食品中のビタミン C 含量の測定と体内レベルの関係を明確にすることが、ビタミン C の必要量の基準策定に重要である。ビタミン C は極めて不安定であり、例えば血漿や血清を分離したのち適切な処理を行わなければ、すぐに分解して正しい値を得ることが困難である。一方、これまで生体内ビタミン C レベルを反映する指標としては血漿や血清が利用されてきたが、最近ではビタミン C を多量に含む白血球ビタミン C 濃度が生体のビタミン C レベルを適切に反映する指標と考えられている。ただし、その摂取量と生体濃度の関連などについては明確にはされていない。

食品中のビタミン C は通常ヒドラジン-UV-HPLC 法で測定されているが、この方法は全てのビタミン C を酸化型に変換して測定するため、還元型と酸化型のビタミン C を分別定量することが難しく、分析操作も煩雑であるという問題がある。最近、電気化学検出 (ECD) -HPLC 法によるビタミン C の分析も行われている。以上の状況を考慮し、本実験では生体内ビタミン C を適切に評価できる生体試料の選定、ビタミン C の迅速かつ簡便な分析方法の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 食品中のビタミン C 測定

食品中のビタミン C 濃度は 5 訂食品成分表に利用されているヒドラジン-UV-HPLC 法<sup>(1)</sup>ならびに既報の ECD-HPLC 法<sup>(2)</sup>で行った。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。分析方法の概略は図 1 に示した通りである。分析した野菜や果物は、チンゲン菜、ピーマン (緑)、いちご、

ジャガイモ (男爵)、ブロッコリー、かいわれ大根、ごぼう、りんご (ふじ)、みかん (いよかん)、バナナ、キウイフルーツ、にんじん、菜の花、ニガウリ、ほうれん草、ピーマン (赤)、アボカドである。ECD 法による分析では酸化型ビタミン C (デヒドロアスコルビン酸) の測定も可能であることから、メタリン酸で前処理した試料をジチオスレイトールにより還元処理し HPLC-ECD 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, 4.6x100mm) を用い、移動相は 200 $\mu$ M EDTA 及び 500 $\mu$ M 塩化 n-ドデシルトリメチルアンモニウム含有 200mM リン酸-リン酸カリウム緩衝液 (pH 3.0)、流速は 0.9ml/min、ECD 加電圧は +350mV (Ag/AgCl)、試料の注入量は 2 $\mu$ l とした。ヒドラジン-UV-HPLC 法の分析条件としては、カラムにセンシユー科学 Silica-2150-N(100) 6mm x 150mm) 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 1.5ml/分、検出器は可視吸光検出器 (495nm)、注入量は 20 $\mu$ l とした。

### 2. 生体試料中のビタミン C 濃度の測定

血液は肘正中皮静脈より採取し、直ちに 4 $^{\circ}$ C、1000g 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 1ml の 2mM EDTA 含有 PBS と混合後、Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS 0.2ml を下層に注入し、室温、4500g 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 2mM 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。

### 3. 糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミン C 濃度の測定

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 137mg/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. 葉酸の測定方法の検討

分析に利用する菌体にはクロラムフェニコール耐性 L.casei(ATCC27773) を用いた。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。

（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. 食品中のビタミンCの測定方法に関する検討

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法で比較したところ、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2）。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1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。

### 2. 生体試料中のビタミンC濃度の測定に関する検討

生体成分中のビタミンC濃度は微量であることから、測定感度の高いECD-HPLC法により分析した。ビタミンCの生体内濃度を反映する指標としては、血漿と血球で検討した。ビタミンCは不安定であることから、採血後のビタミンC濃度の変動を検討したところ、試料を4℃程度に冷却し、直ちに5%のメタリン酸と混合して凍結保存すれば血漿でもリンパ球でも安定した値を得ることができた。一般に好中球のビタミンCが適切な生体内ビタミンCの評価指標といわれているが、好中球は細胞を単離するまでに時間を要する。さらに好中球を分離する際に共存する赤血球を溶血して除去しなければならないことから、好中球の分離調製操作でビタミンCが分解する可能性もある。そのため体内ビタミンCレベルの評価指標として利用する血液細胞は、容易に単離できるリンパ球が適切であると考えられた。

### 3. 糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミンC濃度の比較

図3に示したように糖尿病患者の血漿

ビタミンC濃度は健常者と差異はなかったが、リンパ球ビタミンC濃度は健常者に比べて有意に低かった。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。この場合も血漿ビタミンC濃度に差異はなかった。

### 4. 葉酸の分析方法についての検討

葉酸は種々の化学形態をとっており、それら全てを測定するためには微生物学的測定法が適している。しかし、その方法は労力と時間を要し、再現性に問題があった。そこで、分析に利用する*L.casei*にクロラムフェニコール耐性菌、菌体をグリセロールに懸濁して凍結保存して菌体を速やかに分析に利用できる処理方法、測定にマイクロプレートを利用する方法を採用した。このような対応により無菌操作の必要はなく、容易にできる条件が設定できた。

## D. 考察

ビタミンCは食品中でも生体試料中でも不安定であり、その分析は迅速に行わなければならない。生体試料中のビタミンC濃度の測定は、試料が十分に得られない場合が多いことから測定感度の高いECD-HPLC法が適していると考えられる。一方、食品中のビタミンC濃度の測定は総ビタミンC（アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸）を測定するヒドラジン-UV-HPLC法による分析が一般的な方法となっている。今回、食品中のビタミンC測定もECD-HPLC法が利用できるかどうか、また一般的な分析方法であるヒドラジン-UV-HPLC法との測定値の関連を17種類の野菜と果物を分析することにより比較検討した。結果に示したように2つの方法により分析した値は極めてよい相関を示すことが明らかになった。ECD-HPLC法によるビタミンCの分析は、測定操作のステップも少なく、感度も高く、さらに必要ならば酸化型のデヒドロアスコルビン酸と還元型のアスコルビン酸も分別定量できることから、食品のビタミンC分析においても優れた方法と考えられる。ECD-HPLC法では試料をメタリン酸で磨砕して、希釈するだけでHPLCの分析試料を調製することができる。そのため、食事

摂取基準の策定において、摂取食品そのものを利用したビタミン C 含量の測定も容易に行うことが可能である。

体内のビタミン C 濃度を反映する評価指標としては、好中球ビタミン C がよいとされているが、好中球は分離に時間を要するという問題があるが、リンパ球は血液からの単離が容易であり、迅速に測定試料を調製することができるため、ビタミン C の評価指標に適していると考えられる。一方、血球のビタミン C 濃度は摂取量が 100mg/日ではほぼ飽和することが知られている<sup>(3, 4)</sup>。この事実は、摂取量が 100mg/日以下の時は、血球ビタミン C が優れた生体指標となるが、100mg/日以上ではビタミン C の摂取量が増加しても血球ビタミン C 濃度は増加しないことを示唆している。血漿ビタミン C は約 500mg/日程度まで摂取量の増加とともに血漿濃度も増加する<sup>(3, 4)</sup>。従って、たんに摂取量との関連を調べる生体指標としては血漿ビタミン C 濃度がより適していると考えられる。

糖尿病等の状態では生体が酸化ストレスを受けることから血漿ビタミン C 濃度の低下が想定される。本研究で糖尿病患者のビタミン C 濃度を測定したところ、血漿ではビタミン C 濃度の低下が認められなかったが、リンパ球では低下が認められ、さらに糖尿病の合併症を有する患者ではより有意なビタミン C 濃度の低下が起こるという結果を得た。この事実は、疾病等のある場合は、血漿ビタミン C と血球ビタミン C 濃度が異なった挙動を示す可能性を示唆する。いずれにしても、生体内ビタミン C レベルを評価する生体指標としては、血漿とともに血球（リンパ球）中の濃度も把握する必要があるものと考えられる。

葉酸の分析については、微生物学的定量方法を採用し、その測定条件を設定した。今後、この方法を利用して、食事葉酸の摂取レベルと葉酸の体内濃度を詳細に検討することができると考えられる。

#### E. 結論

ビタミン C の分析方法としては、食品ならびに生体試料のいずれにおいても、電気化学検出 (ECD) -HPLC 法が、従来のヒ

ドラジン-UV-HPLC 法よりも適した方法であると考えられた。また、ビタミン C の生体指標としては評価対象者の状態に応じて血漿とリンパ球の両方を用いることが適切と考えられた。葉酸については、食品中の多様な形態の葉酸を分析できる微生物学的な分析方法の条件設定を行った。

#### 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

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. 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.

#### 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

#### I. 引用文献

1. 五訂日本食品標準成分表分析マニュアル 科学技術庁資源調査会食品成分部会編 (平成 9 年 4 月) 社団法人資源調査会発行

2. 梅垣 敬三, 吉村 美香, 西牟田 守, 江指 隆年: 「電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフィーによる血漿ビタミン C の定量方法に関する

- る検討」日本栄養・食糧学会誌 52(2): 107-111 (1999)
3. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 93: 3704-9.
  4. Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, et al. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 9842-6.

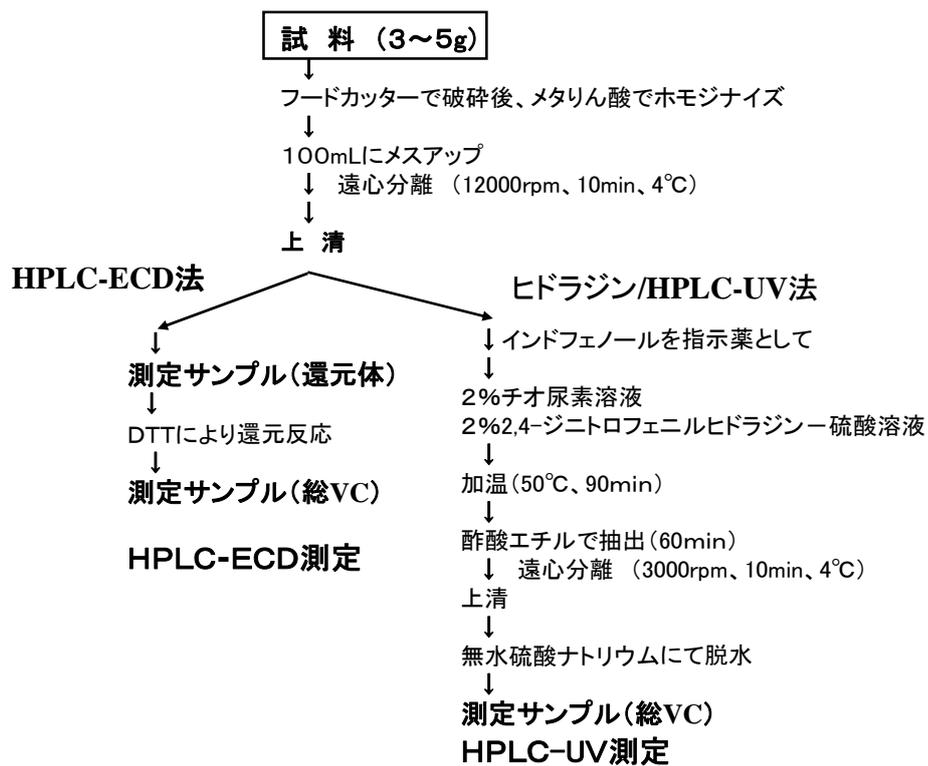


図1 電気化学検出 (ECD) HPLC 法ならびにヒドラジン-UV-HPLC 法によるビタミン C 測定方法の概略

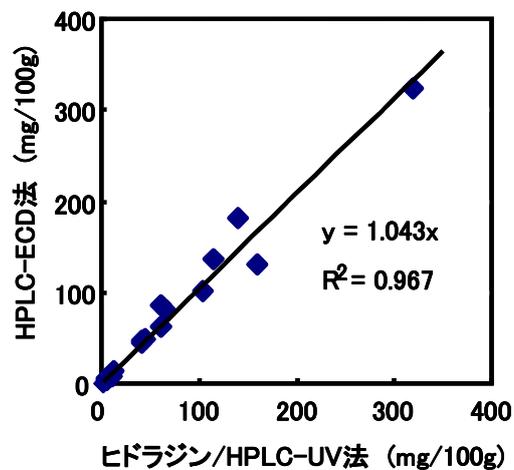


図 2 野菜と果物のビタミンC含量の測定における ECD-HPLC 法とヒドラジン HPLC 法の比較. 17種類の野菜と果物のビタミンC含量を ECD (電気化学検出)-HPLC 法とヒドラジン-HPLC 法で測定した.

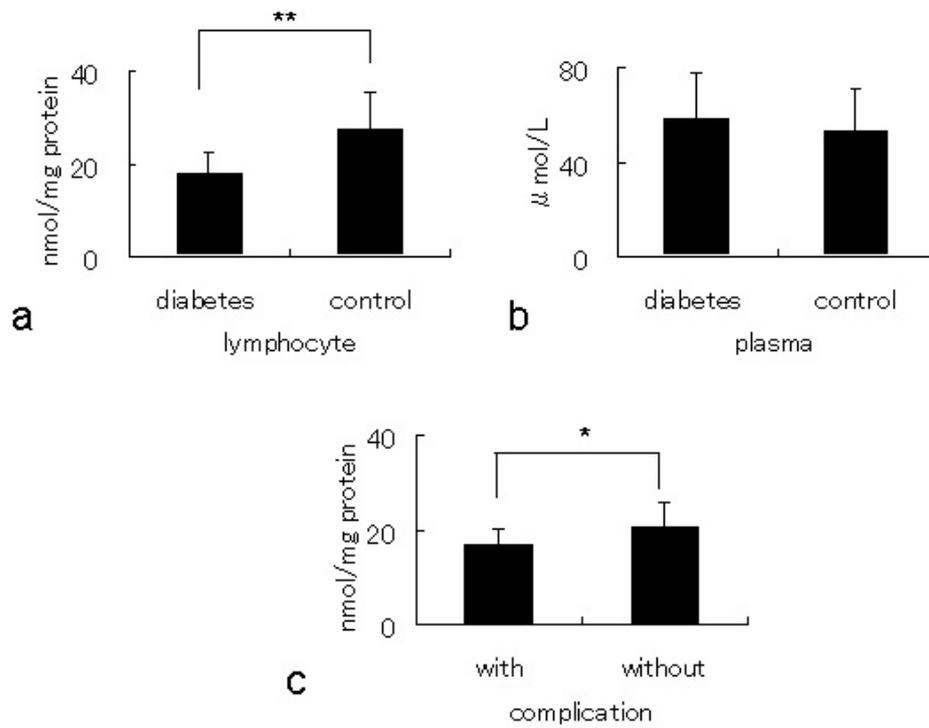


図3 II型糖尿病患者の血漿とリンパ球のビタミンC濃度  
a: リンパ球のビタミンC濃度, b: 血漿ビタミンC濃度,  
c: リンパ球ビタミンC濃度 (合併症の有無)