

Table 2 Values of anthropometric characteristics and lifestyle variables by quintile of EI/BMR. Values are expressed as mean \pm standard deviation, unless specified otherwise

	Quintile of EI/BMR					P-value
	First quintile (n = 377)	Second quintile (n = 378)	Third quintile (n = 378)	Fourth quintile (n = 378)	Fifth quintile (n = 378)	
EI/BMR	0.94 \pm 0.12	1.20 \pm 0.06	1.38 \pm 0.05	1.59 \pm 0.08	2.05 \pm 0.26	<0.001
Body weight (kg)	54.8 \pm 9.2	52.5 \pm 7.1***	51.7 \pm 6.7***	50.6 \pm 5.8***	49.5 \pm 5.9***	<0.001
Body height (cm)	158.2 \pm 5.3	158.0 \pm 5.2	157.9 \pm 5.2	157.9 \pm 5.2	157.8 \pm 5.1	0.896
BMI (kg m ⁻²)	21.9 \pm 3.3	21.0 \pm 2.6***	20.8 \pm 2.4***	20.3 \pm 2.1***	19.9 \pm 2.0***	<0.001
BMR (MJ day ⁻¹)	5.5 \pm 0.6	5.3 \pm 0.4***	5.3 \pm 0.4***	5.2 \pm 0.4***	5.1 \pm 0.4***	<0.001
Energy intake (MJ day ⁻¹)	5.1 \pm 0.8	6.4 \pm 0.6***	7.3 \pm 0.6***	8.3 \pm 0.7***	10.5 \pm 1.7***	<0.001
Sports club activity (days/month)	1.46 \pm 3.79	1.52 \pm 3.58	1.54 \pm 4.29	1.87 \pm 4.18	1.92 \pm 4.33	0.365
Sedentary (%)†	90	89	90	85	85	0.052
Active (%)‡	10	11	10	15	15	
Smoking habits (%)†						
Current	4	3	3	2	3	0.221
Former	4	3	2	3	3	
Never	92	94	95	96	94	
Alcohol drinking habits (%)†						
Non-drinker	79	82	79	83	76	0.130
Drinker	21	18	21	17	24	

EI – energy intake; BMR – basal metabolic rate; BMI – body mass index.

† Percentage of the subjects (%): significant differences between all categories by chi-square test.

‡ Subjects who participated in sports club activity at least once per week were defined as 'active'.

Significance level compared with the first quintile of EI/BMR: ***, $P < 0.001$.

rather than to overreport, their energy intake, similar to the situation observed in Western populations.

To evaluate the validity of energy intake and to identify underreporters, the Goldberg cut-off value has been used widely^{14,24–27}. We did not use the value in the present study, however, for the following two reasons. First, we did not collect enough information to estimate the physical activity level of the population, which is needed to use the Goldberg cut-off value²⁸. Second, the purpose of the present study was to evaluate EI/BMR, and to investigate its association with reported nutrient and food group intakes rather than to detect under- or over-reporters. In this analysis, we excluded 36 subjects with energy intakes of less than 3.0 MJ day⁻¹ or more than 14.4 MJ day⁻¹. We also conducted the analyses including

these 36 subjects ($n = 1925$). The results did not change materially (data not shown).

We used the standard formula proposed by FAO/WHO/UNU²². But the prediction formulas for BMR might be inadequate for estimating the true BMR in Japanese populations. According to a previous report, the BMR calculated from the FAO/WHO/UNU formula (1985) was 103 kcal day⁻¹ (314 kJ day⁻¹) higher than the measured BMR in female Japanese populations aged 6.8–78.5 years²⁹. Taking this into account, our results might overestimate the number of underreporters. To the contrary, the range of 2.0–2.4, which is suggested as the maximum value for a sustainable lifestyle, was included in the fifth quintile of EI/BMR. Therefore, the results should be interpreted cautiously both for possible under- and

Table 3 Intakes of energy and nutrients by quintile of EI/BMR. Values are expressed as mean \pm standard deviation†

	Quintile of EI/BMR					P-value
	First quintile (n = 377)	Second quintile (n = 378)	Third quintile (n = 378)	Fourth quintile (n = 378)	Fifth quintile (n = 378)	
Total fat (% of energy)	26.5 \pm 6.0	29.2 \pm 6.0***	30.0 \pm 6.0***	32.4 \pm 5.9***	34.0 \pm 5.9***	<0.001
SFA (% of energy)	8.2 \pm 2.2	9.2 \pm 2.2***	9.5 \pm 2.2***	10.1 \pm 2.1***	10.5 \pm 2.1***	<0.001
MUFA (% of energy)	9.2 \pm 2.5	10.3 \pm 2.5***	10.6 \pm 2.5***	11.5 \pm 2.4***	12.2 \pm 2.4***	<0.001
PUFA (% of energy)	6.4 \pm 2.0	7.0 \pm 2.0***	7.1 \pm 2.0***	7.8 \pm 2.0***	8.1 \pm 2.0***	<0.001
Protein (% of energy)	14.0 \pm 2.7	14.5 \pm 2.6**	14.7 \pm 2.7***	15.0 \pm 2.6***	14.7 \pm 2.6***	<0.001
Carbohydrate (% of energy)	58.0 \pm 7.1	55.0 \pm 7.1***	54.0 \pm 7.1***	51.6 \pm 6.9***	50.0 \pm 6.9***	<0.001
Alcohol (% of energy)	0.3 \pm 1.1	0.2 \pm 1.1*	0.2 \pm 1.1	0.2 \pm 1.1*	0.4 \pm 1.1	0.013
Calcium (mg/10 MJ)	699 \pm 293	755 \pm 292**	769 \pm 293***	806 \pm 285***	776 \pm 285***	<0.001
Iron (mg/10 MJ)	10.7 \pm 2.8	11.2 \pm 2.8**	11.3 \pm 2.8***	11.7 \pm 2.7***	11.4 \pm 2.7***	<0.001
Sodium (mg/10 MJ)	4440 \pm 1517	4740 \pm 1511**	4708 \pm 1518**	4901 \pm 1476***	4974 \pm 1478***	<0.001
Vitamin C (mg/10 MJ)	154.5 \pm 80.1	148.7 \pm 79.8	153.4 \pm 80.1	159.5 \pm 77.9	152.0 \pm 78.0	0.153
Dietary fibre (g/10 MJ)	16.6 \pm 5.3	16.5 \pm 5.3	16.5 \pm 5.3	16.8 \pm 5.2	15.9 \pm 5.2**	0.001

EI – energy intake; BMR – basal metabolic rate; SFA – saturated fatty acids; MUFA – monounsaturated fatty acids; PUFA – polyunsaturated fatty acids.

† Mean values were adjusted by sports club activity.

Significance level compared with the first quintile of EI/BMR: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Table 4 Intakes of food groups (g/10 MJ) by quintile of EI/BMR. Values are expressed as mean \pm standard deviation

	Quintile of EI/BMR					P-value
	First quintile (n = 377)	Second quintile (n = 378)	Third quintile (n = 378)	Fourth quintile (n = 378)	Fifth quintile (n = 378)	
Cereals	663.0 \pm 158.5	574.2 \pm 157.8***	546.3 \pm 158.6***	474.8 \pm 154.1***	427.4 \pm 154.3***	<0.001
Potatoes	45.6 \pm 31.2	42.9 \pm 31.0***	44.9 \pm 31.2***	46.1 \pm 30.3***	48.5 \pm 30.4***	0.025
Confectioneries†	84.0 \pm 55.9	94.2 \pm 55.7	96.7 \pm 55.9*	98.7 \pm 54.3***	110.0 \pm 54.4***	<0.001
Fats and oil‡	22.3 \pm 18.9	24.5 \pm 18.9	25.0 \pm 18.9	30.1 \pm 18.4***	33.7 \pm 18.4***	<0.001
Pulses	62.9 \pm 49.1	68.1 \pm 48.9	65.9 \pm 49.1	71.0 \pm 47.7*	63.5 \pm 47.8	0.089
Fruits	128.7 \pm 150.8	128.4 \pm 150.2	130.2 \pm 150.9	154.3 \pm 146.6**	150.0 \pm 146.9*	0.011
Total vegetables§	293.5 \pm 170.3	292.7 \pm 169.6	300.2 \pm 170.4	311.1 \pm 165.6	292.0 \pm 165.9	0.047
Soft drinks						
Sugar-containing	44.9 \pm 100.5	43.3 \pm 100.5	50.7 \pm 100.5	48.1 \pm 100.5	65.5 \pm 100.6**	0.017
Non-sugar containing	20.8 \pm 66.7	15.6 \pm 66.7	20.7 \pm 66.7	13.3 \pm 66.7	19.7 \pm 66.7	0.317
Fish	80.7 \pm 53.6	88.3 \pm 53.4*	91.6 \pm 53.6**	95.3 \pm 52.1***	98.5 \pm 52.2***	<0.001
Meats	77.0 \pm 45.7	83.3 \pm 45.5*	87.1 \pm 45.7***	92.5 \pm 44.4***	97.7 \pm 44.5***	<0.001
Eggs	38.9 \pm 34.1	41.4 \pm 34.0	42.1 \pm 34.2	43.0 \pm 33.2	36.1 \pm 33.2	0.011
Dairy products	188.8 \pm 182.5	211.9 \pm 181.7*	217.5 \pm 182.6*	232.5 \pm 177.4***	213.0 \pm 177.7*	0.003

EI – energy intake; BMR – basal metabolic rate.

Energy-adjusted values by density method were used for analysis.

† Including sugar and sweeteners.

‡ Including animal fat and vegetable fat.

§ Including green and yellow vegetables, non-green and yellow vegetables, mushrooms and sea vegetables.

Significance level compared with the first quintile of EI/BMR: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

overreporters. In addition, we applied BMR and BMI calculated from self-reported body weight and height. They might be biased (for example, see reference 30). However, some studies have reported that BMI calculated from self-reported body height and weight correlated highly with measured BMI^{31,32}. These studies suggest that BMI calculated from self-reported body weight and height is, at least, a reliable measure for use in association analyses. We have therefore used these values both in our previous paper³³ and the present report.

Several previous studies have examined non-dietary factors such as physiological and psychological factors associated with energy intake^{3,26,34,35}. Here, we examined the effects of physical activity, smoking habits and alcohol intake on reported energy intake (Table 2). The proportion of the active group was increasing slightly, whereas that of the sedentary group was decreasing, along with the increase in EI/BMR, which indicates that a more active lifestyle is associated with higher energy requirements. As for psychological factors, we examined the association between EI/BMR and desire for body weight change, expressed as the difference between ideal and present BMI (data not shown). We observed a linear trend between EI/BMR and the difference in BMI. However, when present BMI, the difference between ideal and present BMI, sports club activity and smoking habits were entered in a model for multiple regression analysis, the difference between ideal and present BMI did not reach a significant level. Therefore, present BMI seems, at least in this population, to be the most important factor affecting the reporting of food intakes and predicting underreporting.

We examined whether low-energy reporters under-reported all nutrients equally or reported some specific

nutrients lower than others. Energy from carbohydrate was significantly higher, whereas that from fat was significantly lower, in the lower quintiles of EI/BMR (Table 3). Among the micronutrients examined, vitamin C was not significantly different across the EI/BMR groups. According to the review by Livingstone and Black³, energy from protein tends to be reported significantly higher, whereas that from fat is reported lower, in low-energy reporters.

Few studies have examined the bias in reporting of meal patterns and the types of food consumed^{26,36,37}. In previous studies, low-energy reporters tended to report the consumption of 'socially desirable' foods such as fish, fruit and salad higher, whereas 'socially undesirable' foods such as snacks, cakes, sugar and fats were reported lower. According to Hebert *et al.*³⁸, women show higher 'social desirability' scores associated with lower reported fat and energy intakes than do men. In the present study (Table 4), the reported intake of cereals was higher, while in contrast intakes of confectioneries, fats and oil, fish and meats were lower, in the lower EI/BMR groups. We analysed the data on soft drinks divided into sugar-containing and non-sugar containing drinks. Neither type of drink correlated significantly with EI/BMR, which is somewhat different from the results observed in Western populations²⁷.

Our results might not be representative because the subjects were not a random sample of the general Japanese population, but selected female dietetics students aged 18–20 years. Because they were freshmen enrolled in dietetics courses, the participants in this study might be highly health-conscious. To minimise the influence of nutritional education, we finished the survey within almost one month after their entrance to the course. According to the Japanese National Nutrition Survey in 1998, the percentages of subjects aged 15–19 years with

BMI $< 18.5 \text{ kg m}^{-2}$ and $\geq 25 \text{ kg m}^{-2}$ were 20% and 6%, respectively³⁹. It was 16% and 5%, respectively, in the present study. The distribution of BMI was not markedly different between the two surveys. Compared with Western populations⁴⁰, Japanese women are generally leaner in this age range. Nevertheless, we observed the tendency of underreporting, rather than overreporting, similar to that found in Western populations. This indicates that inaccuracy of energy intake should be taken into account when the results of dietary surveys are interpreted, even in a non-obese population such as young Japanese women.

In summary, our study found a significant correlation between BMI and EI/BMR. Moreover, a majority of the subjects underreported their energy intake in spite of being relatively lean. However, the participants in this study were not representative of the Japanese population as a whole. Further studies are needed to examine whether the correlations observed in the present study are commonly observed in other Asian as well as in other Japanese populations.

Acknowledgements

We wish to thank Drs Keiko Amano, Akane Katagiri, Taeko Shimoda, Tomiko Tsuji and Hatsuko Yamamoto for study planning and data collection, and Shoko Matsunaga for data processing.

References

- Barrett-Connor E. Nutrition epidemiology: how do we know what they ate? *American Journal of Clinical Nutrition* 1991; **54**(Suppl. 1): 182S–75.
- Black AE, Cole TJ. Biased over- or under-reporting is characteristic of individuals whether over time or by different assessment methods. *Journal of the American Dietetic Association* 2001; **101**: 70–80.
- Livingstone MB, Black AE. Markers of the validity of reported energy intake. *Journal of Nutrition* 2003; **133**(Suppl. 3): 895S–920S.
- Schoeller DA. Recent advances from application of doubly labeled water to measurement of human energy expenditure. *Journal of Nutrition* 1999; **129**: 1765–8.
- Schoeller DA. Validation of habitual energy intake. *Public Health Nutrition* 2002; **5**(6A): 883–8.
- Black AE, Coward WA, Cole TJ, Prentice AM. Human energy expenditure in affluent societies: an analysis of 574 doubly-labelled water measurements. *European Journal of Clinical Nutrition* 1996; **50**: 72–92.
- Hill RJ, Davies PS. The validity of self-reported energy intake as determined using the doubly labelled water technique. *British Journal of Nutrition* 2001; **85**: 415–30.
- Trabulsi J, Schoeller DA. Evaluation of dietary assessment instruments against doubly labeled water, a biomarker of habitual energy intake. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 2001; **281**(5): E891–9.
- Goldberg GR, Black AE, Jebb SA, Cole TJ, Murgatroyd PR, Coward WA, et al. Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology. 1. Derivation of cut-off values to identify under-reporting. *European Journal of Clinical Nutrition* 1991; **45**: 569–81.
- Black AE, Goldberg GR, Jebb SA, Livingstone MBE, Cole TJ, Prentice AM. Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology: 2. Evaluating the results of published surveys. *European Journal of Clinical Nutrition* 1991; **45**: 583–99.
- Fogelholm M, Männistö S, Vartiainen E, Pietinen P. Determinants of energy balance and overweight in Finland 1982 and 1992. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 1996; **20**: 1097–104.
- Price GM, Paul AA, Cole TJ, Wadsworth MEJ. Characteristics of the low-energy reporters in a longitudinal national dietary survey. *British Journal of Nutrition* 1997; **77**: 833–51.
- Voss S, Kroke A, Klipstein-Grobusch K, Boeing H. Is macronutrient composition of dietary intake data affected by underreporting? Results from the EPIC–Potsdam study. *European Journal of Clinical Nutrition* 1998; **52**: 119–26.
- McGowan MJ, Harrington KE, Kiely M, Robson PJ, Livingstone MBE, Gibney MJ. An evaluation of energy intakes and the ratio of energy intake to estimated basal metabolic rate (EI/BMR_{est}) in the North/South Ireland Food Consumption Survey. *Public Health Nutrition* 2001; **4**(5A): 1043–50.
- Briefel RR, Sempos CT, McDowell MA, Chien S, Alaimo K. Dietary methods research in the third National Health and Nutrition Examination Survey: under-reporting of energy intake. *American Journal of Clinical Nutrition* 1997; **65**: S1203–9.
- Heywood P, Harvey PJW, Marks GC. An evaluation of energy intake in the 1983 Australian National Dietary Survey of Adults. *European Journal of Clinical Nutrition* 1993; **47**: 604–6.
- Winkvist A, Persson V, Hartini TNS. Underreporting of energy intake is less common among pregnant women in Indonesia. *Public Health Nutrition* 2002; **5**(4): 523–9.
- Sasaki S, Yanagibori R, Amano K. Self-administered diet history questionnaire developed for health education: a relative validation of the test-version by comparison with 3-day diet record in women. *Journal of Epidemiology* 1998; **8**: 203–15.
- Sasaki S, Ushio F, Amano K, Morihara M, Todoriki O, Uehara Y, et al. Serum biomarker-based validation of a self-administered diet history questionnaire for Japanese subjects. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2000; **46**(6): 285–96.
- Science and Technology Agency. *Standard Tables of Food Composition in Japan*, 4th revised ed. Tokyo: Printing Bureau, Ministry of Finance, 1982 [in Japanese].
- Matsuzawa Y, Inoue S, Ikeda Y, Sakata T, Saito Y, Sato Y, et al. The judgment criteria for new overweight, and the diagnostic standard for obesity. *Obesity Research* 2000; **6**: 18–28 [in Japanese].
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization/United Nations University (FAO/WHO/UNU). *Energy and Protein Requirements*. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Technical Report Series No. 724. Geneva: WHO, 1985.
- Ministry of Health and Welfare. *Recommended Dietary Allowance for Japanese: Dietary Reference Intakes*, 6th revised ed. Tokyo: Ministry of Health and Welfare, 1999 [in Japanese].
- Braam LA, Ocke MC, Bueno-de-Mesquita HB, Seidell JC. Determinants of obesity-related underreporting of energy intake. *American Journal of Epidemiology* 1998; **147**(11): 1081–6.
- Ferrari P, Slimani N, Ciampi A, Trichopoulou A, Naska A, Lauria C, et al. Evaluation of under- and overreporting of energy intake in the 24-hour diet recalls in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutrition* 2002; **5**(6B): 1329–45.
- Mathys C, De Henauw S, Devos C, De Backer G. Estimated

- energy intake, macronutrient intake and meal pattern of Flemish adolescents. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003; **57**(2): 366–75.
- 27 Johansson L, Solvoll K, Bjørneboe G-EA, Drevon CA. Under- and overreporting of energy intake related to weight status and lifestyle in a nationwide sample. *American Journal of Clinical Nutrition* 1998; **68**: 266–74.
- 28 Black AE. Critical evaluation of energy intake using the Goldberg cut-off for energy intake: basal metabolic rate. A practical guide to its calculation, use and limitations. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2000; **24**: 1119–30.
- 29 Yamamura C, Kashiwazaki H. Factors affecting the post-absorptive resting metabolic rate of Japanese subjects: reanalysis based on published data. *Japanese Journal of Nutrition* 2002; **60**(2): 75–83 [in Japanese].
- 30 Rovira RF, Pons IF, Martinez MI, Sanchez RR. Self-reported versus measured height, weight and body mass index in Spanish Mediterranean teenagers: effects of gender, age and weight on perceptual measures of body image. *Annals of Nutrition & Metabolism* 2002; **46**: 68–72.
- 31 Goodman E, Hinden BR, Khandelwal S. Accuracy of teen and parental reports of obesity and body mass index. *Pediatrics* 2000; **106**: 52–8.
- 32 Kuczmarski MF, Kuczmarski RJ, Najjar M. Effects of age on validity of self-reported height, weight, and body mass index: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Journal of the American Dietetic Association* 2001; **101**: 28–34.
- 33 Sasaki S, Katagiri A, Tsuji T, Shimoda T, Amano K. Self-reported rate of eating correlates with body mass index in 18-y-old Japanese women. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2003; **27**: 1405–10.
- 34 Asbeck I, Mast M, Bierwag A, Westenhöfer J, Acheson KJ, Müller MJ. Severe underreporting of energy intake in normal weight subjects: use of an appropriate standard and relation to restrained eating. *Public Health Nutrition* 2002; **5**(5): 683–90.
- 35 Kant AK. Interaction of body mass index and attempt to lose weight in a national sample of US adults: association with reported food and nutrient intake, and biomarkers. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003; **57**(2): 249–59.
- 36 Burns C, Jackson M, Gibbons C, Stoney RM. Foods prepared outside the home: association with selected nutrients and body mass index in adult Australians. *Public Health Nutrition* 2002; **5**(3): 441–8.
- 37 Berteus Forslund H, Lindroos AK, Sjostrom L, Lissner L. Meal patterns and obesity in Swedish women – a simple instrument describing usual meal types, frequency and temporal distribution. *European Journal of Clinical Nutrition* 2002; **56**(8): 740–7.
- 38 Hebert JR, Clemow L, Pbert L, Ockene IS, Ockene JK. Social desirability bias in dietary self-report may compromise the validity of dietary intake measures. *International Journal of Epidemiology* 1995; **24**: 389–98.
- 39 Ministry of Health and Welfare. *Kokumin Eiyō no Genjō (Annual Report of the National Nutrition Survey in 1998)*. Tokyo: Ministry of Health and Welfare, 2000; 45–6 [in Japanese].
- 40 Schoenborn CA, Adams PF, Barnes PM. Body weight status of adults: United States, 1997–98. *Advance Data* 2002; **6**(330): 1–15.

外挿法

エビデンスの乏しい性・年齢階級への対応

Watanabe Toshiaki 渡邊敏明 兵庫県立大学環境人間学部生活環境学科

Key word

食事摂取基準, 外挿, 基準体位, 体表面積, 推定エネルギー必要量, 除脂肪体重

1. はじめに

栄養調査は、多くの場合、健常な成人を対象としたものである。これは、成人のデータは、生活習慣病を考えるための基礎的なものとして重要であり、多くの関心をもたれていることや、被験者が自分の健康に関心を持ち、ボランティアとして参加の同意を得やすいことなどによる。しかしながら、成長期にある健康な若年者や生理的な機能が低下してくる高齢者については、調査が限定され、データも十分でない。

乳児についても同じような問題がある。離乳前の乳児の場合には、母乳栄養児では、正常な健康状態が保たれていると考えられるため、母乳から摂取した栄養素量が乳児の必要量を賄っていると考えられている。しかし、離乳後の乳児については、調査データが限られている。このようなことから、食事摂取基準(推定平均必要量・目安量・上限量)の策定において、これらの年齢階級の必要量を科学的にどのように考えたらよいかという課題がある。

栄養調査には、食事記録調査法や陰膳法などがあり、これらの結果から、食事摂取基準が、一日あるいは体重当たりで求められている。文献より得られた参考とすべき食事摂取基準は、多くの場合、ある限られた集団において観察されたものである。そこで、この基準となる集団の食事摂取基

準を利用して、なんらかの方法を用いて、データがない性・年齢階級の食事摂取基準を設ける必要がある。この方法を「外挿法」という。すべての栄養素に同じ方法で外挿することはむずかしく、外挿を行うには、個々の栄養素の栄養学的特性を考慮する必要がある。

本稿では、「2005年改定日本人の食事摂取基準」の策定において、議論されていることに基づいて、外挿法の概略を解説する。とくに筆者が策定に携わったビタミンを例に、現時点で利用可能な資料を参考にして、具体的に述べる。

2. 外挿法の基本的な考え方

外挿には、体重、BMI、体表面積、エネルギー量、たんぱく質摂取量などを基準とした方法が考えられる。すべての栄養素の特性を考慮した外挿方法を決定することは困難である。表1および表2は、ビタミンの食事摂取基準を策定する際、成人および乳児の食事摂取基準からの外挿方法をまとめたものである。それぞれビタミンの栄養学的特性を考慮して、異なった方法が使われている。

近年、エネルギー代謝効率と体表面積の間に高い相関があることに着目し、さらに、身長および(または)体重から体表面積を推定する式を考案し、これが広く用いられている¹⁾。身長および(または)体重から体表面積を推定する式は多数提案されているが、第六次改定日本人の栄養所要量の策定から、Kleiberが1947年に提唱した、体重比の0.75乗を用いる方法が採用されている²⁾。これについては、最近、さらに詳細な検討が行われ、哺乳動物の循環器ならびに呼吸器重量の推定を含

表1 水溶性ビタミンの外挿方法

ビタミン	1歳以上	高齢者	6～(月)児
ビタミンB ₁		エネルギーのEER(成人からの外挿)	体表面積(0～(月)児と成人の平均値)
ビタミンB ₂		エネルギーのEER(成人からの外挿)	体表面積(0～(月)児と成人の平均値)
ビタミンB ₆	たんぱく質のRDA(成人からの外挿)	成人と同値	体表面積(0～(月)児と成人の平均値)
ビタミンB ₁₂	体表面積(成人からの外挿)	成人と同値	体表面積(0～(月)児と成人の平均値)
ナイアシン		エネルギーのEER(成人からの外挿)	体表面積(0～(月)児と成人の平均値)
パントテン酸		成人と同値	体表面積(0～(月)児からの外挿)
葉酸	体表面積(成人からの外挿)	成人と同値	体表面積(0～(月)児と成人の平均値)
ビオチン	体表面積(成人からの外挿)	成人と同値	体表面積(0～(月)児からの外挿)
アスコルビン酸	体表面積(成人からの外挿)	成人と同値	体表面積(0～(月)児と成人の平均値)

表2 脂溶性ビタミンの外挿方法

ビタミン	1歳以上	高齢者	6～(月)児
ビタミンA	体表面積(成人からの外挿)		0～(月)児と同値
ビタミンD	成人と同値	成人に付加量	0～(月)児と同値
ビタミンE	除脂肪体重(成人からの外挿)	成人と同値	0～(月)児と同値
ビタミンK	体表面積(成人からの外挿)	成人と同値	0～(月)児と食事からの摂取量

む各種生物の器官重量の推定に有用である、と報告されている³⁾。

3. 成人からの外挿法

成人を対象とした栄養調査結果の若年者(小児および青少年)への外挿法について、推定平均必要量・目安量が、1日当たりの摂取量(g/日、など)で与えられている場合と体重1kg当たりで与えられている場合に分けて説明する。

1) 推定平均必要量・目安量が1日当たりの摂取量(g/日、など)で与えられている場合

$$X_{X/A} = X_A \times (W_X/W_A)^{0.75} \times (1+G)$$

を用いて外挿することができる。

ただし、

$X_{X/A}$ = 求めたい年齢階級 X の推定平均必要量・目安量 (1日当たりの摂取量)

W_X = 求めたい年齢階級 X の基準体位の体重

X_A = 基準とする対象者(成人)の推定平均必要量・目安量 (1日当たりの摂取量)

W_A = 基準とする対象者(成人)の体重(平均値または中央値)

G = 成長因子(表3)

である。

表3 推定平均必要量・目安量の推定に用いた成長因子

年齢階級	成長因子
0月～2歳	0.3
3～14歳	0.15
15～17歳(男児)	0.15
15～17歳(女児)	0
18歳以上	0

2) 推定平均必要量・目安量が、体重1kg当たりで与えられている場合

$$X_{X/A} = X_A \times W_X \times (1+G)$$

を用いて外挿することができる。

ただし、

$X_{X/A}$ = 求めたい年齢階級 X の推定平均必要量・目安量 (1日当たりの摂取量)

W_X = 求めたい年齢階級 X の基準体位の体重(kg)

X_A = 基準とする対象者(成人)の推定平均必要量・目安量 (体重1kg当たりの摂取量)

G = 成長因子(表3)

である。

小児の場合は、成長の影響を加味する必要がある。これには、①成長に利用される量、②成長にともなって体内に蓄積される量の2種類がある。これらを考慮するために、成長因子を乗じる。成

表4 基準体位

年齢	男性		女性*	
	身長(cm)	体重(kg)	身長(cm)	体重(kg)
0~5カ月	62.2	6.6	61	6.1
6~11カ月	71.5	8.8	69.9	8.2
1~2歳	85	11.9	84.7	11
3~5歳	103.5	16.7	102.5	16
6~7歳	119.6	23	118	21.6
8~9歳	130.7	28	130	27.2
10~11歳	141.2	35.5	144	35.7
12~14歳	160	50	154.8	45.6
15~17歳	170	58.3	157.2	50
18~29歳	171	63.5	157.7	50
30~49歳	170	68	156.8	52.7
50~69歳	164.7	64	152	53.2
70歳以上	160	57.2	146.7	49.7

*妊娠中の者を除く。

長因子には、WHO/UNA が採用し⁴⁾、アメリカ/カナダの食事摂取基準⁵⁾も踏襲している値を、表3に示すように、わが国の年齢階級区分に合うように改定した。この結果、今回の改定からわが国の年齢階級の区分が変わるために、3歳児の補正係数が日本では0.15、米国では0.3と、日米で2倍の違いがあるが、科学的根拠はとくにない。

4. 基準体位

食事摂取基準では、性・年齢階級別に一つの代表値を算定するにとどまっておき、階級内における体位特性（身長や体重）は考慮に入っていない。つまり、食事摂取基準は、年齢階級内のもっとも典型的な体位として策定する。その体位として、1歳以上には、2001（平成13）年国民栄養調査⁶⁾における当該の性・年齢階級における身長・体重の中央値を用い、0~11カ月の乳児に関しては、平成12年乳幼児身体発育調査⁷⁾のデータより該当月数の集団の中央値を用いている。これを「基準体位」と呼ぶ（表4）。

5. 外挿法の留意点

推定平均必要量・目安量は、1日当たりの摂取量（g/日、など）として得られることが多く、一方、上限量は体重1kg当たりの摂取量として得られ

ることが多い。このため、上限値を外挿する場合は、同じ栄養素でも異なる方法が必要とされる。

異なる性に対する外挿が必要な場合、たとえば、男性の値が既知で女性の値を求めたい場合にも、特定の理由がない場合は、性差は考慮せずに外挿する。ただし、栄養素ごとに、対象とする性・年齢階級の特徴を十分に考慮したうえで外挿方法を定めるべきである。

なお、推奨量については、外挿はせず、当該の性・年齢階級の推定平均必要量から求めている。また、目標量については、年齢階級ごとに、推奨量や目安量、現在の摂取量中央値を用いて求め、外挿はしていない。

6. 乳児からの外挿法

●0~5カ月児

出生後6カ月未満の乳児では「推定平均必要量」や「推奨量」を決定するための実験は不可能である。そして、健康な乳児が摂取する母乳の質と量は乳児の栄養状態にとって望ましいものと考えられる。このような理由から、例外を除き、乳児における食事摂取基準は、母乳の栄養成分ならびに健康な乳児の母乳摂取量を根拠に「目安量」を算定することができる。この期間を通じた哺乳量は0.78 l/日前後との報告があるため⁸⁾、今回は0.78

l/日を基準哺乳量としている。

しかしながら、栄養素によっては、母乳中含量の個人差が大きく、母乳中含量から必要量を算出できないことがある。たとえば、ビタミンDの場合には、欠乏症であるくる病の発症率を指標として、必要量が算出されている。

●6～11カ月児

この時期の食事摂取基準を算出する方法としては、3つに大別できる。これらの方法は、栄養素のそれぞれの特徴を考慮して、使い分けられている。

1) 0～5カ月児からの外挿

0～5カ月児の食事摂取基準から外挿する場合には、

$$X_{6-11/0-5} = X_{0-5} \times (W_{6-11}/W_{0-5})^{0.75}$$

という式が提案されている。ただし、

$X_{6-11/0-5}$ = 求めたい6～11カ月児の食事摂取基準

W_{6-11} = 求めたい6～11カ月児の基準体位の体重(kg)

X_{0-5} = 基準とする0～5カ月児の食事摂取基準

W_{0-5} = 基準とする0～5カ月児の基準体位の体重(kg)

なお、この場合、成長因子は考慮しない。これは、0～5カ月児が成長途中であり、その食事摂取基準のなかに成長因子に帰する分が含まれていると考えられるからである。

基準体位の体重を代入すると、男女それぞれ、 $(8.8/6.6)^{0.75}$ 、 $(8.2/6.1)^{0.75}$ となり、1.24、1.25となる。いずれの式を用いるかは、栄養素によって異なるが、おおむね、近似した値が得られる。水溶性ビタミンであるパントテン酸とビオチンは、この方法で外挿した。

2) 母乳と離乳食の混合食

食事摂取基準を算定すべき科学的根拠が乏しい場合には、6～11カ月の乳児は、母乳(または人工乳)と通常の食品との混合食であると仮定し、0～5カ月児の食事摂取基準と1～2歳児のそれを考慮

して算定することができる。算定のための十分な根拠が得られない場合は、5カ月と2歳の間の食事摂取基準の変化が直線的であると仮定して得られる式、

$$X_{6-11} = (5 \times X_0 + 2 \times X_1) / 7$$

を用いる。ただし、

X_{6-11} = 求めたい6～11カ月の乳児の食事摂取基準

X_{0-5} = 基準とする0～5カ月児の食事摂取基準

X_{1-2} = 基準とする1～2歳児の食事摂取基準

第2の方法としては、0～5カ月の食事摂取基準(AI)および成人の食事摂取基準(RDAあるいはAI)を利用して、それぞれから食事摂取基準を平均したものを6～11カ月児の食事摂取基準とすることができる。

つまり、

$$X_{6-11} = (X_{6-11/0-5} + X_{6-11/A}) / 2$$

という式を用いる。ただし、

X_{6-11} = 求めたい6～11カ月の乳児の食事摂取基準

$X_{6-11/0-5}$ = 0～5カ月児から外挿した6～11カ月児の食事摂取基準： $X_{0-5} \times (W_{6-11}/W_{0-5})^{0.75}$

$X_{6-11/A}$ = 成人から外挿した6～11カ月児の食事摂取基準： $X_A \times (W_{6-11}/W_A)^{0.75} \times (1+0.30)$

水溶性ビタミンのパントテン酸とビオチン以外は、この方法で外挿している。

このほかの方法としては、ビタミンKは、離乳期以降は母乳のほかに食事からとるようになるので、母乳以外の食事からの摂取量も考慮して、6～11カ月の乳児の食事摂取基準を算出することができる。

3) 0～5カ月児と同量

乳児期を通して、哺乳量を0.78lとしているので、ビタミンAは0～5カ月児の食事摂取基準と同じ値にしている。

つまり、

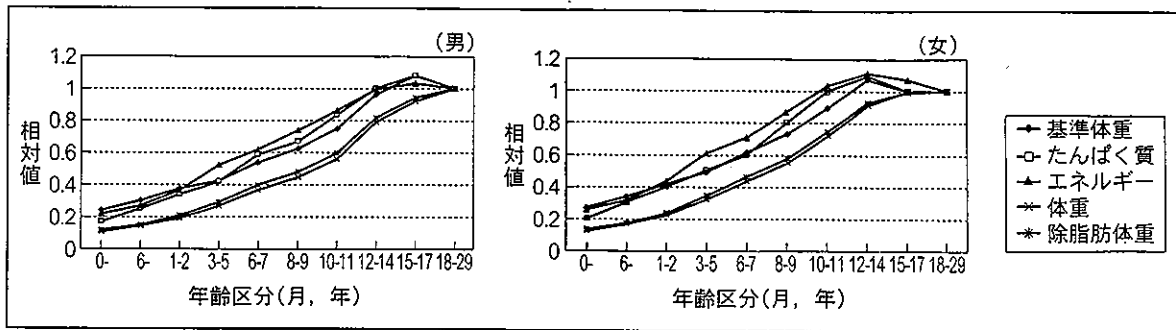


図1 わが国の成人男女からの外挿の比較

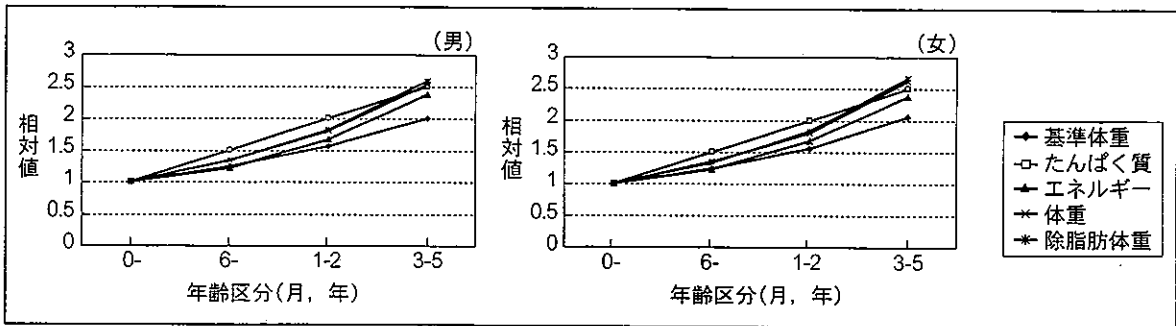


図2 わが国の0~5カ月乳児からの外挿の比較

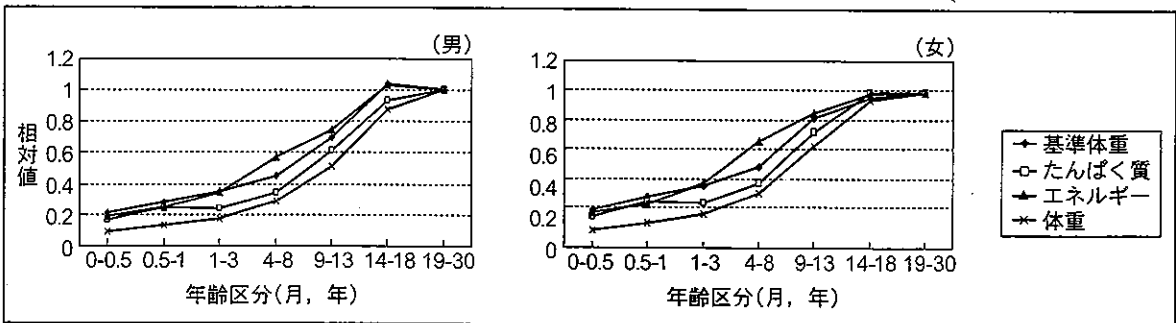


図3 米国における成人男女からの外挿の比較

$$X_{6-11} = X_{0-5}$$

となる。ただし、

X_{6-11} = 求めたい6~11カ月の乳児の食事摂取基準

X_{0-5} = 基準とする0~5カ月の乳児の食事摂取基準

なお、ビタミンDおよびEは、母乳中の含有量が個人差が大きいため使用できないうえ、乳児での調査データが0~5カ月の乳児と6~11カ月の乳児とが分けられていないために、同じ食事摂取基準を使用している。

7. 若年者（小児および青少年者）

食事摂取基準の策定のための資料価値を有する研究で、発育期にある若年者を対象としたものは少ない。そこで、十分な資料が存在しない場合には、一般に、先に示した3-1)および3-2)の外挿方法を用いて、成人の算定値から推定することができる。

図1および図2は、わが国における18~29歳の年齢階級の成人を基準にして、5つの方法で外挿した場合の違いを比較したものである。男女とも、

表5 外挿方法の違いによる比較(成人からの外挿) (男性)

年齢	体表面積 ^a	体表面積 ^b	基準体重 ^c	EER ^d	たんぱく質 ^e	除脂肪体重 ^f
0-(月)	42.0	42.0	42.0	42.0	52.0	26.8
6-(月)	52.1	52.5	56.0	49.0	78.0	35.6
1-2	88.9	163.9	45.0	87.2	104.0	48.6
3-5	114.6	192.2	63.1	124.0	115.0	69.1
6-7	128.9	193.2	86.9	148.3	161.0	94.6
8-9	149.3	213.1	105.8	176.2	184.0	114.6
10-11	178.4	239.2	134.2	206.7	230.0	142.3
12-14	230.7	265.4	189.0	239.1	276.0	195.4
15-17	258.9	276.0	220.3	248.1	299.0	225.6
18-29	240.0	240.0	240.0	240.0	240.0	240.0
30-49	252.6	245.4	257.0	238.2	240.0	249.8
50-69	241.4	246.4	241.9	216.6	240.0	234.8
70-	221.9	239.4	216.2	165.4	240.0	214.1

^a体表面積(Kleiberの式): 体重(W:kg)から算出

$$(W/W)^{0.75}(1+G)$$

^b体表面積(Du Boisの式の変形): 身長(H:cm)と体重(W:kg)から算出

$$(H^{0.725} \times W^{0.425} \times 75.05)(1+G)$$

^c基準体重:(kg)

^dEER: 推定エネルギー必要量(kcal/日)

^eたんぱく質: 1g当たりの摂取量を4とした場合

^f除脂肪体重: 身長(H:m)と体重(W:kg)から算出

$$\text{男性} = 1.10 \times W - 128 \times W^2 / (100 \times H)^2$$

$$\text{女性} = 1.07 \times W - 148 \times W^2 / (100 \times H)^2$$

体重(いわゆる発育)、除脂肪体重と比較して、基準体重、たんぱく質の摂取量および推定エネルギー必要量(EER)との間に大きな差異が認められる。しかしながら、前者3つのどの方法で外挿しても、あまりはつきりとした違いはみられない。特定の年齢階級によっては、いずれの外挿でもほとんど同じ値となっている。水溶性ビタミンのビタミンB₁、B₂およびナイアシンは、エネルギーのEERから外挿入している。ビタミンB₆およびビタミンEの外挿は、それぞれたんぱく質摂取量および除脂肪体重から行っている。このほかのビタミンB₁₂、葉酸、ビオチン、アスコルビン酸およびビタミンKは体表面積から外挿している。

8. 高齢者

高齢者の特徴は、栄養摂取能力、栄養吸収能力などの生理機能の個人差が大きいことである。また、多くの人々が、なんらかの疾患を有していることも特徴としてあげられる。そのため、年齢だけ

でなく、個人の特徴に十分に注意を払うことが必要である。水溶性ビタミンのビタミンB₁、B₂およびナイアシンは、エネルギーのEERから外挿しているため、高齢者で食事摂取基準が成人に比べ低くなっている。しかし、これ以外の水溶性および脂溶性ビタミンは成人と同じ値である。なお、ビタミンDは、骨折の予防のため、食事摂取基準が成人より高値である。

9. 今後の課題

図3は米国のデータを基に成人からの外挿を試みたものである。わが国のものと異なる点としては、基準体重、たんぱく質、およびエネルギー摂取量による外挿がそれぞれ異なっており、特色がみられている。わが国との相違については、今後検討が必要と考えられる。

表5は、異なった外挿方法で、成人から食事摂取基準を算出したものである。いずれの値を使用するかは、個々の栄養素が有している生理的機能

に依存している。しかしながら、すべての栄養素は複雑な関連をもちながら生理機能を維持している。このようなことから、今後すべての栄養素に共通した外挿方法が必要と考えられる。

文献

- 1) Kleiber, M.: Body size and metabolic rate. In: Kleiber, M.: The Fire of Life: An Introduction to Animal Energetics, Robert Krieger Publishing Company, Huntington, New York, 1975, p. 179-222.
- 2) Kleiber, M.: Body size and metabolic rate. *Physiol. Rev.*, 27: 511-541, 1947.
- 3) West, G.B., Brown, J.H., Enquist, B.J.: A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science*, 276: 122-126, 1997.
- 4) FAO/WHO/UNA (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization/United Nations): Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNA expert consultation. Technical report series. No. 724. World Health Organization, Geneva, 1985.
- 5) The B vitamins and choline: overview and methods. In: Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes For Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academy Press, Washington D.C., 1998, p. 27-40.
- 6) 健康・栄養情報研究会: 平成 13 年厚生労働省国民栄養調査結果, 2003.
- 7) 加藤則子, 奥野晃正, 高石昌弘: 平成 12 年乳幼児身体発育調査結果について. *小児保健研究*, 60: 707-720, 2001.
- 8) 鈴木久美子, 佐々木晶子, 新澤佳代・他: 離乳前乳児の哺乳量に関する研究. *栄養学雑誌*, 62 (印刷中), 2004.

●お知らせ

10月号次号予告欄でご案内しました〔特別企画〕第26回欧州静脈経腸栄養学会(ESPEN)ハイライトニュースは、12月号より掲載いたします。

〈短報〉

ビオチン欠乏状態の指標としての尿中3-ヒドロキシイソ吉草酸 の高速液体クロマトグラフィによる測定法の検討

渡邊 敏明^{*1)}、大口 憲一¹⁾、榎原 周平¹⁾、福井 徹²⁾

Assay of 3-hydroxyisovaleric acid determination as an indicator of biotin deficiency

Toshiaki Watanabe^{*1)}, Ken-ichi Oguchi¹⁾, Shuhei Ebara¹⁾ and Toru Fukui²⁾

Summary The determination of 3-hydroxyisovaleric acid (3-HIA) using high-performance liquid chromatography (HPLC) after derivatization with 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride (2-NPH·HCl) was studied. The derivatized 3-HIA was extracted into *n*-hexane and separated isocratically on a C8 reversed-phase column with YMC-FA. 3-HIA was detected in urine obtained from biotin-deficient mice. 3-HIA was assayed with high accuracy by the present HPLC method, which is superior to the previously published GC/MS method because of its simplicity, time savings, and cost.

Key words: 3-Hydroxyisovaleric acid, High-performance liquid chromatography, Biotin deficiency, Methylcrotonyl CoA carboxylase

I. 緒言

ビオチンは、カルボキシラーゼの補酵素として、炭酸固定反応や炭酸転移反応などに関与している。カルボキシラーゼは、糖新生、アミノ

酸代謝および脂肪酸合成などに重要な役割を果たしている。このうちβ-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ(MCC)は、ロイシンの分解過程における酵素の一つである。このため、ビオチンが欠乏すると、この酵素の活性が低下し、

*1) 兵庫県立大学環境人間学部生活環境学大講座
〒670-0092 姫路市新在家本町1-1-12

2) 病体生理研究所
〒173-0025 東京都板橋区熊野町47-11

受領日 平成16年7月1日
受理日 平成16年8月10日

*1) Department of Environment for Life and Living,
School of Human Science and Environment, University
of Hyogo,
1-1-12 Shinzaike Honcho, Himeji, Hyogo 670-0092,
Japan
E-mail: watanabe@shse.u-hyogo.ac.jp
2) Byotai Seiri Laboratory
47-11 Kumano, Itabashi-ku, Tokyo 173-0025, Japan

有機酸の一つである3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-hydroxyisovaleric acid, 3-HIA) の尿中への排泄が増加する³⁾。

3-HIAは、一般に一定期間のピオチン欠乏状態が続かなければ尿中への顕著な増加となって表れてこない。しかし、ピオチン欠乏症状である皮膚炎や脱毛が発現する前に尿中での増加が認められることから、ピオチン欠乏の早期発見の診断指標として期待されている。Mockら (1997) は、妊婦の尿中に3-HIAが増加することを見出し、これが生体内ピオチン状態の指標として有用であることを報告している³⁾。

3-HIAの測定には、これまでガスクロマトグラフィ質量分析装置 (GC/MS) が用いられていた³⁾。しかしGC/MSを利用した測定法は、前処理が煩雑な上に、高価な機器を要することが多いため、汎用性が低い。このため、これまでGC/MS測定法に関しては十分な検討がなされていないとは言えない。そこで、本研究では、前処理が簡単で、汎用性の高い高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いた尿中3-HIAの定量方法について検討した。

II. 方法

1. 前処理方法

3-hydroxyisovaleric acid (東京化成工業 (株) 東京) は脱イオン水にて1 mg/ml溶液を作製し3-HIA標準溶液とした。試料は、ピオチン欠乏飼料およびピオチン対照飼料を6週間与えたマウスから採取した尿を用いた。なお、本動物実験は「実験動物の飼育及び保管等に関する基準 (昭和55年3月総理府告示第6号)」に則って実施した。

3-HIA標準溶液および試料の前処理には、高速液体クロマトグラフィ用遊離型短鎖・長鎖脂肪酸分析キット ((株)ワイエムシー、京都) を用いた⁴⁾。本キットは脂肪酸のカルボキシル基を2-ニトロフェニルヒドラジド (2-NPH) に変換する標識化試薬である。これにより、簡単な操作で紫外および可視部での高感度検出が可能になる。

前処理の手順は以下のとおりである。

1) 試料100 μ lを共栓付試験管に入れ、20 mM 2-NPH \cdot HCl 200 μ l、および250 mM 1-ethyl-3-

(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide \cdot HCl 200 μ lを順次加えて混合し、60 $^{\circ}$ C、20分間加温した。
2) 15% KOH (20%メタノール溶液) 200 μ lを加え、混合し、60 $^{\circ}$ C、15分間加温し、その後室温冷却した。
3) 1/30 mMリン酸緩衝液 (pH6.4) - 0.5M HCl (3.8:0.4) 4 mlおよびn-ヘキサン 5 mlを加え、十分に混合した後、3000rpm、5分間遠心した。
4) 分離したヘキサン層を除去し、n-ヘキサン 5 mlを加えて混合した。3000 rpm、5分間遠心後、再びヘキサン層を除去した。
5) ジエチルエーテル 5 mlを加え、十分に混合した後、3000 rpm、5分間遠心した。遠心後、エーテル層を別の共栓付試験管に採取した。
6) 採取したエーテルに超純水を 3 ml加え、十分に混合した後、3000 rpm、5分間遠心した。エーテル層を新しい試験管に採取した。
7) 採取したエーテル溶液を減圧乾固後、残渣をメタノール 1 mlで溶解し、測定試料とした。

2. スペクトル解析

測定波長設定のため、分光光度計UV mini-1240 (島津製作所 (株)、京都) を用いてスペクトル解析を行った。標識化した3-HIA標準溶液を石英ブラックマイクロセルに入れ、波長190 nm-500 nmの範囲でスペクトル解析を行った結果、波長225 nm-230 nmで吸収極大が認められた。したがって、測定波長は230 nmとした。

3. 測定条件

高速液体クロマトグラフィはHITACHI L-6200インテリジェントポンプ (日立製作所 (株)、東京) を用いた。カラムはシリカゲルを基材とした逆相系のカルボン酸専用分析カラムであるYMC-Pack FA ((株)ワイエムシー、京都) を使用した。カラム温度は50 $^{\circ}$ C、移動相はアセトニトリル、メタノール、純水 (30:16:54, v/v/v) の割合で混合し、0.01N HClでpH4.5に調整した溶液を用いた。流速は1.0 ml/min、UV (230 nm) で測定した。また、3-HIA標準溶液を用い、検量線を作成した。

III. 結果および考察

Fig. 1Aは3-HIA標準液 (1 mg/ml) のクロマト

グラムである。3-HIAは、保持時間 (retention time, RT) 8.32分の位置に検出された。ビオチン欠乏マウスの尿では、RT 8.33分の位置にピークが検出され、マウス尿においても3-HIAの測定が可能であることが示された (Fig. 1B)。一方、ビオチン欠乏マウスにビオチン添加飼料を与えたマウスの尿では、RT 8.73分にピークが認められるが、同じ位置にピークは認められなかった (Fig. 1C)。なお、3-HIAとpeak areaとの間には直線的な関連がみられ、5-1000 μ g/mlの範囲で定量可能であることが示された。

これまでビオチン状態の把握には血清・尿中ビオチン濃度、血清ビオチニダーゼ活性の測定が行われていた。しかし、最近、尿中3-HIAが、ビオチン欠乏症が強く疑われる場合の確定診断として利用されるようになった。

現在、尿中3-HIAはGC/MSによって測定されているが、機器が高価であるだけでなく、測定前処理で、尿中有機酸の抽出・溶離を繰り返し

た後、GCによる分離のために誘導体化する必要があり、操作が煩雑である。このような点も3-HIA測定がビオチン欠乏の指標として一般化しない一つの要因であろう。

今回の著者らの検討で、カルボン酸標識による尿中3-HIA測定法は、前処理が比較的簡易であり、標準的なHPLCシステムで測定可能である。また、ビオチン欠乏尿において十分な感度を得られることが明らかとなった。このことから、生体のビオチン状態の把握において、本法は簡易かつ有用な方法であると考えられる。

IV. 結語

高速液体クロマトグラフィを利用して、ビオチン欠乏の指標となる尿中有機酸の1つの3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-HIA) を検出する方法を検討した。前処理として3-HIAのカルボキシル基を2-ニトロフェニルヒドラジドに変換し、

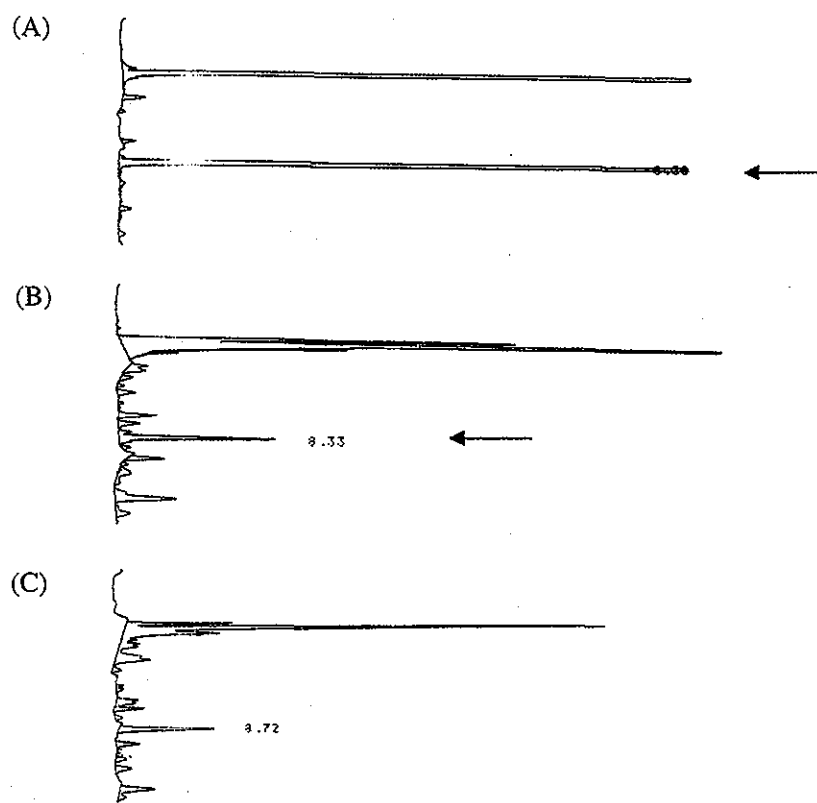


Fig. 1 Chromatogram of HPLC of the derivatized 3-hydroxyisovaleric acid. A, standard; B, urinary extract of biotin-deficient mice; C, urinary extract of control mice. Arrows indicate 3-hydroxyisovaleric acid.

逆相系のカルボン酸専用分析カラムで、アセトニトリル、メタノール、純水の混合液を移動相として、UVにより検出を行なった。標準物質およびビオチン欠乏尿ともほぼ同じ保持時間の位置に3-HIAが検出された。カルボン酸標識によって、高速液体クロマトグラフィを用いた尿中3-HIAが容易に検出できるようになった。

文献

- 1) 渡邊敏明: ビオチン. ビタミンの事典, 日本ビタミン学会編, pp.299-323. 朝倉書店、東京, 1996
- 2) Mock NI, Malik MI, Stumbo PJ, Bishop WP, Mock DM: Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 951-958, 1997
- 3) Mock DM, Jackson H, Lankford GL, Mock NI, Weintraub ST: Quantification of urinary 3-hydroxyisovaleric acid using deuterated 3-hydroxyisovaleric acid as internal standard. *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.*, 18: 652-656, 1989
- 4) Miwa H, Yamamoto M, Nishida T, Nunoi K, Kikuchi M: High-performance liquid chromatographic analysis of serum long-chain fatty acids by direct derivatization method. *J. Chromatogr.*, 416: 237-245, 1987
- 5) Miwa H, Yamamoto M: High-performance liquid chromatographic analysis of serum short-chain fatty acids by direct derivatization. *J. Chromatogr.*, 421: 33-41, 1987
- 6) Teran-Garcia M, Ibarra I, Velazquez A: Urinary organic acids in infant malnutrition. *Pediatr. Res.*, 44: 386-391, 1998

ATPを指標としたビオチンの微生物学的定量法の検討

奥田涼子¹⁾, 谷口歩美¹⁾, 榎原周平¹⁾, 福井徹²⁾, 渡邊敏明¹⁾
(¹⁾兵庫県立大学環境人間学部*, ²⁾病体生理研究所**)

A New Microbioassay for Biotin using ATP Production in *Lactobacillus plantarum*

Ryoko OKUDA¹⁾, Ayumi TANIGUCHI¹⁾, Shuhei EBARA¹⁾, Toru FUKUI²⁾ and Toshiaki WATANABE¹⁾

¹⁾Department of Environment for Life and Living

School of Human Science and Environment, University of Hyogo

²⁾Clinical Laboratory, Byotai Seiri Laboratory

Summary

The microbiological assay is one of the most common methods for biotin determination, which generally uses biotin-dependent *L. plantarum* ATCC 8014. The growth of microorganisms in the presence of biotin was evaluated by turbidity optical density of the assay solution at 610 nm, which is known as a turbidimetric assay. We developed a new improved bioassay for biotin levels using ATP production in *L. plantarum*. The standard curve was linear in the range from 0.01 to 800 pg/ml and the detection levels of this assay as low as 50 pg/ml could be realized. The intra-assay precision test revealed that the reproducibility of duplicates was within 8%. These findings suggest that this ATP assay is more sensitive and simple for the determination of biotin than the classic turbidimetric assay, thus making it appropriate for clinical laboratory use.

ビオチンは、水溶性ビタミンの一つで、カルボキシラーゼの補酵素として、炭酸の転移反応を触媒し、糖新生や分岐鎖アミノ酸代謝、脂肪酸合成及びエネルギー代謝に関与している。このため、ビオチンの摂取量が低下したり、欠乏すると種々の生体影響がおこることが知られている¹⁾。

ヒトではビオチンが欠乏すると、皮膚炎や食欲不振、精神活動の低下などの症状が表れることが確認されている。しかし、ビオチンは種々の食品に含まれているため、成人ではほとんど食事性ビオチン欠乏症はないとされている。一方、乳児では稀ながら認められている。これは、母乳のビオチン含有量が低いこと、消化機能が未熟であること、あるいは難治性下痢によって、吸収障害がもたらされることなどによる。また、妊婦の尿から、ビオチンが不足したときに排泄される3-HIA (3-ヒドロキシイソ吉草酸) が検出されることが報告されており、妊娠期での生理的なビオチン欠乏が示唆されている²⁾。このように、乳幼児や妊婦において、ビオチンの栄養状態を正確に把握することが必要である。

実験動物では、ビオチン欠乏ラットで、体重増加の抑制や、皮膚炎、脱毛などの症状が表れる。また、妊娠動物にビオチン欠乏飼料を与えると、胎仔(胚)の発育や形態に影響をおよぼすことが知られている³⁾。

生体内のビオチン濃度を測定する際、サンプルを採取するときに、被験者の負担をできるだけ軽減する必要がある⁴⁾。このためには採取量を少なくすることが不可欠である。少量のサンプルで測定するには、高感度測定法の開発が必要となる。

*所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

**所在地：東京都板橋区熊野町47-11 (〒173-0025)

現在確立されているビオチンの定量法としては、微生物学的定量法、理学的定量法、酵素定量法などがあり、一般には微生物学的定量法が広く使用されている⁵⁾。しかしながら、濁度に基づく測定では、培養液やサンプル中の不溶性物質の影響を受けやすく、感度を上げることは困難である。そこで、細菌が産生するATPを利用して細菌の増殖を測定する新しい測定法(ATP法)を確立することを検討した。

実験方法

Fig. 1はATP法の手順を示したものである。乳酸菌*L. plantarum* ATCC 8014をMRS培地で前培養し、菌数を濁度で調整($OD_{610nm} = 0.2$)した後、1/100に希釈した。ビオチン定量用培地(日水製薬㈱, 東京)に、調整した乳酸菌を30:1の割合で混ぜ合わせ、よく攪拌した後、エッペンチューブに1mlずつ分注し、さらにサンプルあるいは標準物質を30 μ l添加し、37°Cで24時間培養した。培養後、培養液を約pH7.75に調整するためにリン酸緩衝液(pH7.75)で10倍に希釈し、白色マイクロプレートへ50 μ l分注した。さらに、乳酸菌のATPを抽出するため、ATP抽出試薬(東洋ビーネット㈱, 東京)50 μ lを加え、さらに、ルシフェリン・ルシフェラーゼ試薬(L-L試薬)(東洋ビーネット㈱, 東京)を50 μ l添加し、ただちに発光量をマイクロプレートリーダー(Wallac 1420 ARVOsx, パーキンエルマー・ジャパン㈱, 東京)で測定し、ATP量を求めた。

また、ATP測定にあたり、測定条件設定のため、発光時間の安定性を検討した。ATP標準溶液にL-L試薬を添加した後、1分毎に発光量を測定した。

なお、本定量法の同時再現性は、同一のサンプルを5回測定し、その平均値と標準偏差から、CV(%)を求めた。また、添加回収率は、既知の濃度のサンプル溶液に、ビオチン標準溶液を同量添加し、実測値と理論値の差(%)を求めた。

次に本定量法の実用性を確かめるために、生体試料中のビオチン濃度を定量した。生体試料としては、健康な男性1名から採取した尿を用いた。1日目は、普通食で、午前9時から2時間毎に採尿をし、「コントロール尿」とした。2日目は朝9時に空腹の状態では10mgビオチン(ビオチン散“フソー”, 扶桑薬品工業㈱, 大阪)を服用後、2時間毎に採尿をし、「サプリメント尿」とした。三日目は普通食で、尿は採取せず、四日目は、朝9時に空腹の状態ではゆでた卵黄5個を

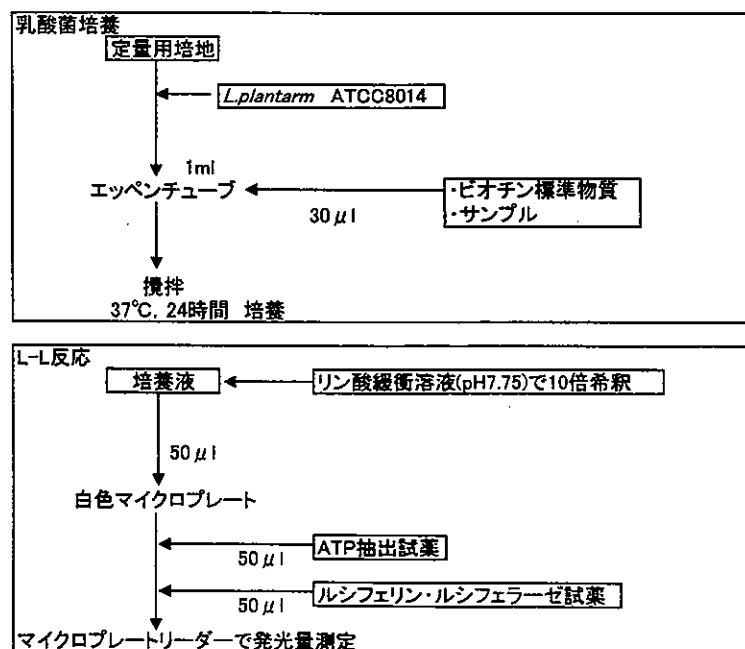


Fig. 1 Procedure of ATP assay.

負荷し2時間毎に採尿をし、「卵黄尿」とした。尿 (100 μ l) は、4.5N硫酸を100 μ l添加し、オートクレーブで加水分解 (121 $^{\circ}$ C, 2気圧、60分) を行った後、4.5N水酸化ナトリウム (約100 μ l) で中和し、サンプルとして供し、ATP法及び比濁法でビオチン濃度を測定した。

尿中のクレアチニン (Cre) 濃度はクレアチニンテストワコー (和光純薬工業㈱, 東京) を用いて測定し、尿中ビオチン量 (μ g/g Cre) の補正を行った。

なお、本研究は、ヘルシンキ宣言 (1964年) (2000年修正)「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」に則って実施した。

結 果

今回使用したL-L試薬は試薬添加後、時間とともに発光量が減衰するといわれている。Fig. 2は減衰の様子をみたものである。発光量は5分間で40%減衰した。

ビオチン濃度が0pg/mlから800pg/mlの標準溶液で発光量 (RLU) をみたものがFig. 3である。発光量をみると、50pg/ml以上でビオチン濃度に依存して増加した。ビオチン濃度と発光量の相関係数は $r = 0.99$ ($p < 0.01$)であった。発光量からS/N比を算出すると、ビオチン10pg/mlで1.4, 25pg/mlで1.8と差がみられなかったが、50pg/mlで2.2, 100pg/mlで3.3であった。なお、同時再現性は8.0%で、添加回収率は、94.1%であった。

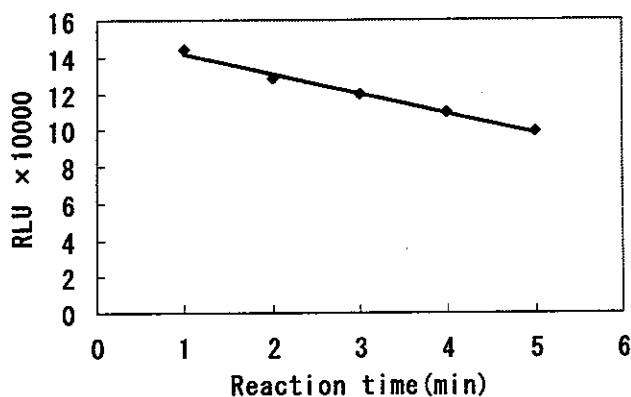


Fig. 2 Time course of luminescent intensity after adding reaction mixture (luciferin and luciferase).

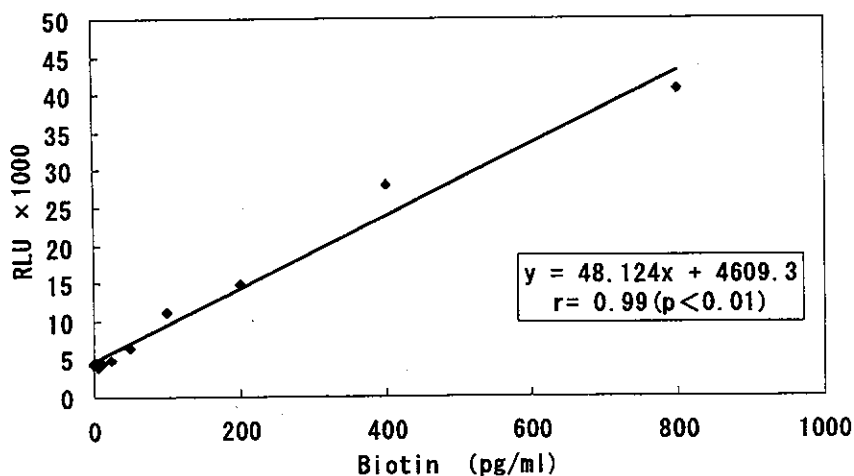


Fig. 3 Standard curve for quantification of biotin using ATP assay.
 Each calibrator sample was determined in duplicate. Points are mean values.

ATP法と従来から用いられてきた比濁法との関係を見たものがFig.4である。両者の回帰直線は $y = 1.88x - 0.32$ で、相関係数は $r = 0.73$ ($p < 0.01$) と有意な正の相関がみられた。しかし、ATP法でのビオチン濃度は平均 $0.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、比濁法でのビオチン濃度は平均 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ と、ATP法で分析した値の方が低い濃度となった。

生体試料での測定結果をFig. 5およびFig. 6に示した。コントロール尿のビオチン濃度は、 $2.0 \sim 4.4 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ で、一日を通して大きな変動は見られなかった。一方、卵黄尿のビオチン濃度は摂取2時間後で $112 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ と高値を示し、摂取4時間後には2時間後と比較して、 $55.9 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ と約半量となった。その後も尿中ビオチン濃度は徐々に減少した。

サプリメント尿のビオチン濃度は摂取2時間後で $3170 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ と高値を示し、摂取6時間後で $659 \mu\text{g}/\text{g Cre}$ と2時間後に比べ約80%減少した。摂取6時間後以降は、ビオチン濃度が目立った変動は見られなかった。

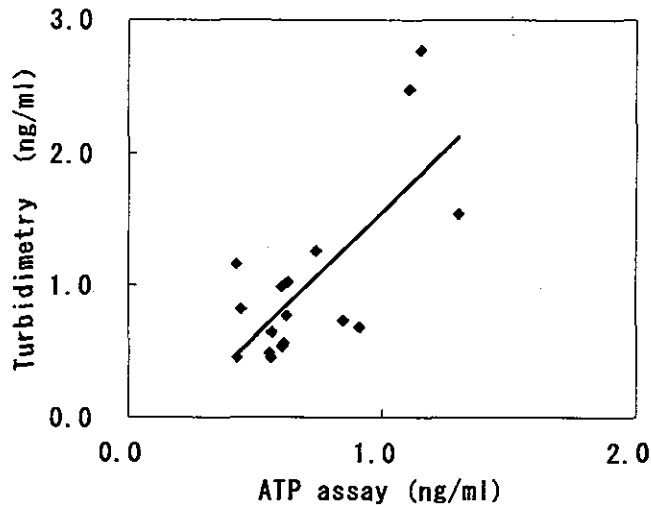


Fig. 4 Correlation between turbidimetric assay and ATP assay.

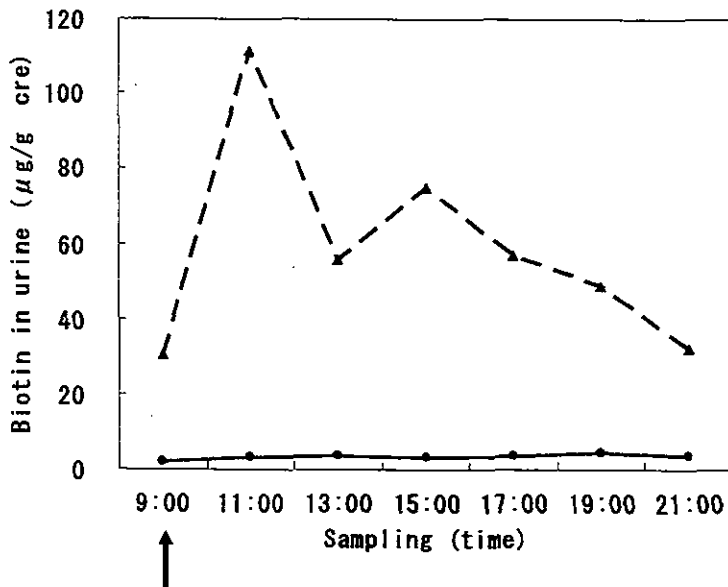


Fig. 5 Change in urine biotin levels after consuming 5 boiled egg yolks containing $60.7 \mu\text{g}$ of biotin totally (free biotin: 70%) in a healthy man.
 ▲: loading, ●: control. Arrow: loading time.

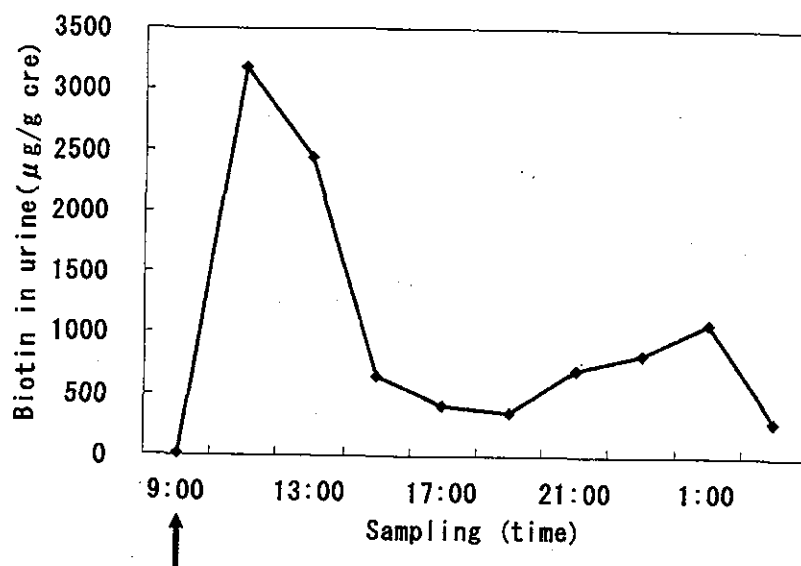


Fig. 6 Change in urine biotin levels after taking 10 mg of biotin in a healthy man. Arrow: loading time.

考 察

本ATP法の特徴として、ビオチンの低濃度域において、ビオチン標準液の濃度と発光量との間には極めて高い相関が認められた。S/N比より、本定量法における検出限界は50pg/mlとした。このように、ATP法は、従来の比濁法の感度200pg/mlに比べ高い感度を示した⁶⁾。しかしながら、同時再現性は8.0%と高い精度が得られなかった。この原因のとして、L-L試薬添加後の測定時間を0.1秒にしたため、測定が安定しなかったのかもしれない。

L-L試薬は反応後、Fig. 2のように発光量が5分で40%減少する。本定量法ではL-L試薬の分注をマニュアルで行っているため、多数のサンプルを一度に測定する際に発光量に差が生じる。このため、測定時間を0.1秒に設定した。しかし、0.1秒では発光量が不安定なため、測定値にばらつきがみられたものと考えられる。今後、安定した測定結果を得るためには、測定時間を長くする必要があるかもしれない。あるいは、自動分注器によるL-L試薬の添加が不可欠かもしれない。

本実験では、ビオチン濃度が比濁法に比べてATP法で低くなった。これは、反応液pHが影響しているものと考えられる。L-L反応はpHが低下すると発光量が減少する。本測定系では、乳酸菌の増殖にともなう乳酸の産生によりpHが低下し、発光量が減少したものと思われた。本来、培養液の遠心沈渣を使用することが望ましいが、測定に迅速性が要求されるため、本定量法では、10倍量のpH7.75のリン酸緩衝液を用いた。しかし、結果的に、pH調整が不十分であった可能性が高い⁷⁾。

Table 1は、現在使用されているビオチン定量法の特徴をまとめたものである。微生物学的定量法は、汎用性の高い測定法である⁸⁻¹⁰⁾。本実験で示したように、微生物が産生するATPを指標として感度をあげることによって、本定量法の用途がさらに広がる。

今回の場合、尿中のビオチン濃度をみると大きな変動はみられなかったことから、一日を通してほぼ一定量のビオチンが尿中に排泄されていると推察される。また、ビオチンサプリメントを摂取した時と、ゆでた卵黄を摂取した時の尿中へのビオチン排泄パターンは、類似していた。尿中への排泄ピークはほぼ2時間後であった。しかし、ビオチンサプリメントを摂取したときの尿の方が、ピーク後尿中ビオチン濃度の減少が著しかった。これは、ビオチンサプリメントに含まれるビオチンは全てが遊離型であるため、すみやかに吸収された。これに対して、ゆでた卵黄中にはタンパク結合型(生卵の卵黄の遊離率71.1%)ビオチンが含まれている。タンパク結合型ビオチンは徐々に遊離し、吸収されたことによるものと推察される。