

表3 プール血漿測定値の従来法との比較

	Retinol ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	β -carotene ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	25(OH) D_3 (ng/mL)	α -tocopherol (mg/mL)
LC-APCI/MS/MS法	55.52 \pm 1.63	28.46 \pm 2.27	22.67 \pm 1.49	13.11 \pm 0.70
従来法	55.99 \pm 3.57 (蛍光検出HPLC法)	22.03 \pm 2.05 (可視検出HPLC法)	22.78 \pm 0.89 (化学発光法)	13.00 \pm 0.37 (蛍光検出HPLC法)

	PK (ng/mL)	MK-4 (ng/mL)	MK-7 (ng/mL)
LC-APCI/MS/MS法	1.77 \pm 0.15	1.92 \pm 0.11	7.49 \pm 0.44
従来法	1.49 \pm 0.12 (蛍光検出HPLC法)	1.95 \pm 0.11 (蛍光検出HPLC法)	7.66 \pm 0.42 (蛍光検出HPLC法)

値はMean \pm S.D.

表 4 母乳試料における添加回収率と同時再現性

	Retinol	β -carotene	Vitamin D ₃	25(OH)D ₃
添加回収率				
Mean \pm S.D. (%)	97.59 \pm 5.38	97.37 \pm 7.04	97.68 \pm 17.66	100.41 \pm 2.19
C.V.(%)	5.52	8.16	18.08	2.18
同時再現性				
Mean \pm S.D.	0.49 \pm 0.01 (μ g/mL)	0.03 \pm 0.00 (μ g/mL)	0.84 \pm 0.04 (ng/mL)	0.19 \pm 0.01 (ng/mL)
C.V.(%)	6.03	3.82	4.80	2.93
	α -tocopherol	PK	MK-4	MK-7
添加回収率				
Mean \pm S.D. (%)	96.33 \pm 5.49	97.53 \pm 8.34	99.35 \pm 7.91	97.08 \pm 5.56
C.V.(%)	5.70	8.55	7.96	5.73
同時再現性				
Mean \pm S.D.	2.84 \pm 0.06 (mg/mL)	0.38 \pm 0.01 (ng/mL)	0.21 \pm 0.00 (ng/mL)	0.12 \pm 0.01 (ng/mL)
C.V.(%)	2.05	3.71	1.85	9.64

表5 母乳試料中脂溶性ビタミン濃度及び推定摂取量

	Retinol	β -carotene	Vitamin D ₃	25(OH)D ₃
測定値 (Mean)	0.42 ($\mu\text{g/mL}$)	0.05 ($\mu\text{g/mL}$)	0.15 (ng/mL)	0.22 (ng/mL)
推定摂取量	331 $\mu\text{g RE/day}$		0.98 $\mu\text{g/day}$	
2005年版食事摂取基準値 (0~5月、目安量)	250 $\mu\text{g RE/day}$		2.5 $\mu\text{g/day}$	

	α -tocopherol	PK	MK-4	MK-7
測定値 (Mean)	4.08 ($\mu\text{g/mL}$)	3.77 (ng/mL)	1.57 (ng/mL)	1.17 (ng/mL)
推定摂取量	3.2 mg/day	4.8 $\mu\text{g/day}$		
2005年版食事摂取基準値 (0~5月、目安量)	3.0 mg/day	4.0 $\mu\text{g/day}$		

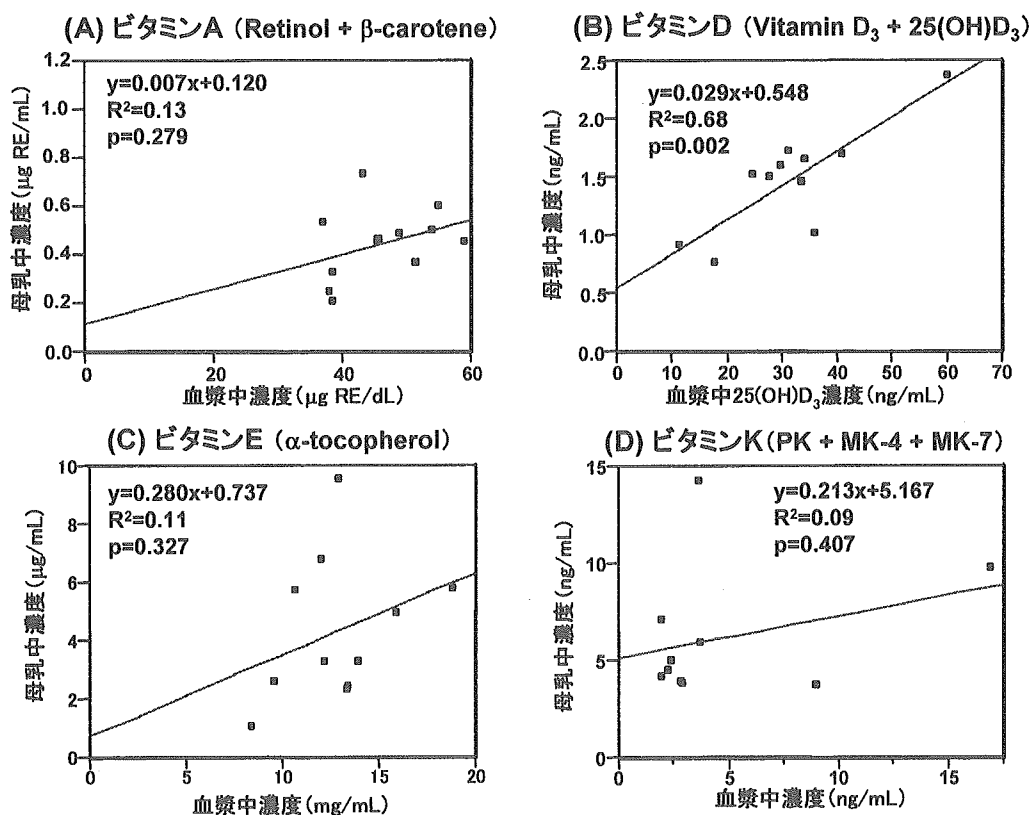


図3 血漿中及び母乳中脂溶性ビタミン濃度の相関

-骨に対するビタミンKの必要量の評価-

表6 血中ビタミンK濃度と骨代謝関連因子との関係

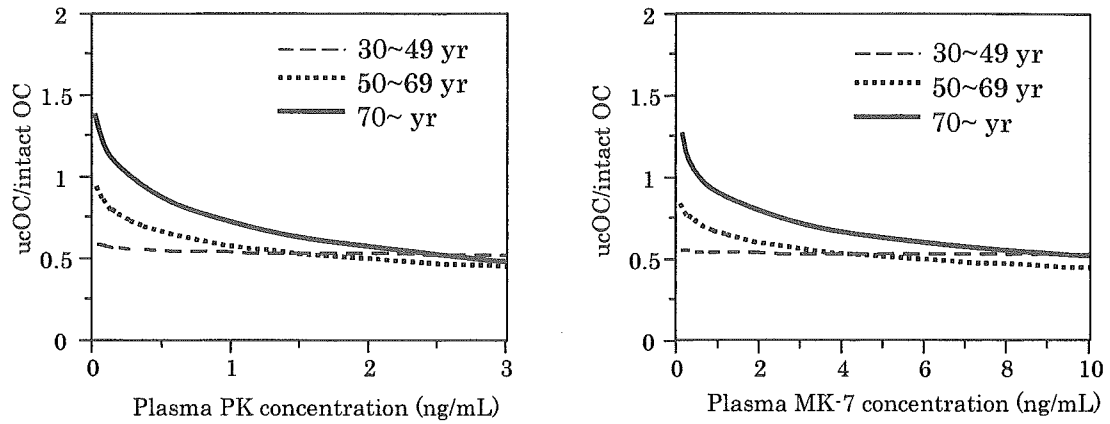
	K ₁		MK-4		MK-7	
	r	p	r	p	r	p
Age	-0.146	0.004	-0.006	0.916	-0.125	0.013
BMI	0.147	0.004	0.093	0.092	0.086	0.087
Cholesterol	0.122	0.016	-0.017	0.759	0.156	0.002
Triacylglycerol	0.342	<0.001	0.047	0.398	0.062	0.221
K ₁	—		—		—	
MK-4	0.153	0.005	—		—	
MK-7	0.173	0.001	0.009	0.875	—	
ucOC	-0.216	<0.001	0.020	0.720	-0.227	<0.001
ucOC/intactOC	-0.203	0.001	-0.005	0.927	-0.181	0.001
NTx	-0.071	0.189	-0.066	0.249	-0.015	0.781
DPD	-0.223	<0.001	-0.065	0.254	-0.091	0.101
BAP	0.013	0.815	0.001	0.988	0.004	0.937

Pearson's correlation coefficient (*r*) and the corresponding *p* values were used to evaluate the relationship of the plasma vitamin K concentration with each parameter.

表7 ステップワイズ重回帰分析による ucOC、ucOC/intactOC 比、尿中 DPD と年齢、PK、MK-7 との関係

	ucOC		ucOC/intactOC		DPD	
	r ²	<i>p</i>	r ²	<i>p</i>	r ²	<i>p</i>
Age	0.054	<0.001	0.030	0.008	0.095	<0.001
PK	0.047	0.001	0.041	0.002	0.050	<0.001
MK-7	0.052	<0.001	0.033	0.009	no relation	

Stepwise multiple linear regression analyses were performed to explore determinants of ucOC, ucOC/intactOC or DPD. Plausible predictors (age, BMI, cholesterol, triacylglycerol, PK, MK-4, MK-7) were included in the original model. Forward stepwise regression was performed, and a *p* value greater than 0.25 was used for variable removal.



Regression curves and p values were obtained from non-linear logarithmic regression analysis using the plasma PK or MK-7 concentration and ucOC/intact OC. Number of subjects were 30~49 yr ($n=52$), 50~69 yr ($n=208$) and 70~yr ($n=136$). The equations of regression curves using the plasma PK concentration and ucOC/intact OC were $y = 0.546 - 0.015 \log x$ ($p=0.8151$) for 30~49yr, $y = 0.589 - 0.117 \log x$ ($p=0.0020$) for 50~69 yr and $y = 0.748 - 0.224 \log x$ ($p=0.0101$) for 70~yr. Intercepts of three age groups were significantly different ($p<0.001$, ANCOVA). The equations of regression curves using the plasma MK-7 concentration and ucOC/intact OC were $y = 0.550 - 0.006 \log x$ ($p=0.8401$) for 30~49yr, $y = 0.677 - 0.094 \log x$ ($p<0.0001$) for 50~69 yr and $y = 0.870 - 0.172 \log x$ ($p=0.0005$) for 70~yr. Significant differences were detected in intercepts ($p<0.001$, ANCOVA) and slopes ($p<0.022$, ANCOVA) of three age groups .

図4 年齢層別の血中 PK, MK-7 濃度と ucOC/intactOC 比の関係

平成 17 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

2. ハンチントン病モデルマウスを用いたトリプトファン-NAD 変換系の解析

分担研究者 福岡伸一 青山学院大学理工学部 教授

研究要旨

食餌性 NAD の必要量を決定するためには、トリプトファンから変換されて合成される内的な NAD の変換効率を正確に知り、これを差し引いた上で策定する必要がある。本研究では、トリプトファンから NAD が変換される代謝経路 (*de novo* 合成系) の鍵酵素であるキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPRT) 遺伝子を人為的に欠損させたマウス (QPRT ノックアウトマウス) を作出することを試みている (現在鋭意進行中)。しかし、QPRT を欠損すると、神経毒性を有するキノリン酸が蓄積することが想定される。今年度は、*de novo* 合成系異常によって想定される基礎的情報を入手することを目的に、キノリン酸レベルの情報 が病態としているハンチントン病に着目し、ハンチントン病モデルマウスを用い、トリプトファン-NAD 変換系への影響について、生化学的検討を行った。

A. 目的

正確な食餌性 NAD の必要量を明らかにするためには、トリプトファンから NAD に変換する経路 (*de novo* 合成系) を完全に遮断した上で、食餌性 NAD のみの寄与を考えることが重要である。*de novo* 合成系の律速酵素として機能しているのが QPRT (キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ; EC2.4.2.19) である。QPRT は、*de novo* 合成系においてキノリン酸から NaMN (ニコチンアミドモノヌクレオチド) に変換する反応を触媒している。ヒト^{1,2)}において、QPRT の一次構造が明らかにされ、297 のアミノ酸からなり、肝臓、腎臓、そして脳に局在することが確認されている。本研究では、内的 NAD 変換を遮断する目的で QPRT 遺伝子を人為的に欠損させたマウス (QPRT ノックアウトマウス) を作出を試みている (現在鋭意進行中)。しかし、QPRT を欠損すると、神経毒性を有するキノリン酸が蓄積することが想定される。今年度は、*de novo* 合成系異常によって想定される基礎的情報を入手することを目的に、キノリン酸レベルの上昇するとされるハンチントン病に着目し、ハンチントン病モデルマウス (HD マウス) を用い、トリプトファン-NAD 変換系への影響について、肝臓・腎臓における代謝酵素活性を測定するとともに、尿中でトリプトファン代謝産物の測定を行った。

B. 研究方法

試料調製

8 週齢及び 11 週齢の HD マウスをジエチルエーテルにより吸引麻酔後、ネンブタールを腹腔投与し完全麻酔した。肝臓、腎臓は液体窒素中で迅速凍結後、 -80°C で保存し

た。尿試料は 8 週齢及び 11 週齢のマウスから回収し、等容の 0.2N HCl を加え、 -20°C 保存した。

凍結保存した腎臓、肝臓に 5 倍容の 50 mM KPB (pH 7.0) を加え、ポリロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。高速冷却遠心機を用いて遠心分離 (4°C , 50000 rpm, 30 min) し、酵素活性測定用試料として上清を回収した。

尿試料は、0.1 N HCl で 1~12 倍希釈した後、遠心分離 (2000 rpm, 5 min) により尿沈渣を沈殿させ、上清を回収した。0.45 μm のフィルター (日本ミリポア株式会社、東京) を用いて濾過し、HPLC 測定用試料とした。

3-HAO の酵素活性測定

3-HAO 活性は Decker ら³⁾が報告した方法を用いて測定した。3-HAO 活性は 3-HAO の反応産物である ACMS 量の増加を 360 nm の吸光度で測定する事により決定した。 25°C にインキュベートした反応溶液 (3.3 mM 3-HA (in 10 mM Tris-acetate buffer) 50 μL 、200 mM Tris-acetate buffer 500 μL 、Milli Q 940 μL) に酵素活性測定用試料 10 μL を加え、360 nm の吸光度測定により、3-HAO 活性として ACMS の生成を測定した。

ACMSD の酵素活性測定

ASMSD 活性は Ichiyama ら⁴⁾が報告した方法を用いて測定した。ACMSD 活性は ACMSD の反応基質である ACMS 量の減少を 360 nm の吸光度で測定する事により決定した。 25°C にインキュベートした反応溶液 (3.3 mM 3-HA (in 10 mM Tris-acetate buffer) 10 μL 、200 mM Tris-acetate buffer 500 μL 、Milli Q 850 μL) に 3-HAO 源 (0.1 g ラ

ット肝臓アセトンパウダー (in 0.01 M Tris-acetate buffer, pH 8.0) を加えて ACMS を生成させ、360 nm の吸光度測定により ACMS の生成を確認した。360 nm の吸光度の上昇 (ACMS の生成) がプラトーに達した時点で酵素活性測定用試料 100 μ L を加え、360 nm の吸光度の低下を測定した。コントロールとして酵素活性測定用試料 100 の代わりに 50 mM KPB(pH 7.0) 100 μ L を加えたものを測定し、実験群とコントロールの差を ACMSD 活性とした。

QPRT の酵素活性測定

QPRT 活性は Shibata ら⁵⁾が報告した方法に用いて測定した。QPRT 活性は QPRT の反応産物である NaMN 量を HPLC で測定する事により決定した。反応溶液 (500 mM KPB(pH 7.0) 50 μ L、10 mM Quinolinic acid 50 mL、10 mM phosphoribosylpyrophosphate 50 μ L、100 mM MgCl₂ 10 μ L、Milli Q 290 μ L、酵素活性測定用試料 50 μ L) を 37°C で 1 時間インキュベートして酵素反応を起こさせた後、沸騰水中で 5 分間インキュベートして反応を停止させた。氷中で 5 分以上放置した後、遠心分離 (4°C, 15000 rpm, 5 min) により上清を回収した。0.45 μ m のフィルター (日本ミリポア株式会社、東京) を用いて濾過し、HPLC 測定用試料とした。試料容量: 20 μ L、移動相: 10 mM KH₂PO₄ (pH 7.0)、tetra-n-butylammonium bromide 1.47 g/L、10% アセトニトリル、流速: 1.0 mL/min、圧: 105 kgf/cm² 程度、カラム: TOSHO 80Ts (ϕ 4.6 \times 250 mm)、カラム温度: 40°C、検出器: HITACHI L-4000、データプロセッサー: HITACHI D-2500、検出方法: 紫外分光光度計 UV 法 (265 nm) の条件で測定を行った。

AnA の定量

AnA は Shibata ら⁶⁾が報告した方法を用いて HPLC により定量した。試料容量: 20 μ L、移動相: 50 mM KH₂PO₄ (pH 3.0)、35% アセトニトリル、流速: 1.0 mL/min、圧: 140 kgf/cm² 程度、カラム: TOSHO TSK-GEL ODS-80Ts (ϕ 4.6 \times 250mm)、カラム温度: 40°C、検出器: SHIMADZU RF-10AXL、データプロセッサー: SHIMADZU CR-8A、検出方法: 蛍光法 (励起波長 340 nm、蛍光波長 410 nm) の条件で測定を行った。

KA の定量

KA は Shibata⁷⁾が報告した方法を用いて HPLC により定量した。試料容量: 2 μ L、移動相: 9.5 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)、5% アセトニトリル、流速: 1.0 mL/min、圧: 112 kgf/cm² 程度、カラム: TOSHO TSK-GEL ODS-80Ts (ϕ 4.6 \times 250mm)、カラム温度: 40°C、検出器: HITACHI F-1050、データプロセッサー: HITACHI D-2500、検出方法: 蛍光法 (励起波長 344 nm、蛍光波長 398 nm) の条件で測定を行った。

XA、3-HA の定量

XA、3-HA は Shibata⁸⁾らが報告した方法を用いて HPLC により同時定量した。試料容量: 20 μ L、移動相: 45.5 mM KH₂PO₄ (pH 3.0)、2.73 μ g/mL EDTA-2Na、9.1% アセトニトリル、流速: 1.0 mL/min、圧: 85 kgf/cm² 程度、カラム: STR ODS-II (ϕ 4.6 \times 250mm)、カラム温度: 40°C、検出器: [キサンツレン酸] HITACHI L-2400 [3-ヒドロキシアンスラニル酸] SHISEIDO NANOSPACE SI-2、データ

プロセッサ：[キサンツレン酸] HITACHI D-2500 [3-ヒドロキシアンスラニル酸] HITACHI D-2500、検出方法：[キサンツレン酸]紫外分光光度計 UV 法 (340 nm) [3-ヒドロキシアンスラニル酸]電気化学検出法 (印加電圧 +500mV) の条件で測定を行った。

QA の定量

QA は Mawatari ら⁹⁾が報告した方法を用いて HPLC により定量した。試料容量：20 μ L、移動相：50 mM KH_2PO_4 (pH 3.8)、1.2% H_2O_2 、0.00045% 水酸化テトラメチルアンモニウム、流速：0.6 mL/min、圧：56 kgf/cm² 程度、カラム：Unisil Q C81 (ϕ 4.6 \times 250 mm)、カラム温度：40 $^\circ\text{C}$ 、検出器：SHIMADZU RF-10AXL、データプロセッサ：SHIMADZU CR-6A、検出方法：蛍光法 (励起波長 326 nm、蛍光波長 380 nm) の条件で測定を行った。

C. 結果

HD マウスの表現型

正常型は正常に体重が増加したが、HD 型は 8 週齢で体重増加がプラトーに達し、その後減少した。10 週齢、11 週齢において、HD 型は有意に体重が低下していた。また、HD 型は、HD に特徴的な舞踏運動を示した。

トリプトファン代謝関連酵素群の酵素活性測定

HD マウスの肝臓および腎臓における Trp 代謝関連酵素 (3-HAO、ACMSD、QPRT) の酵素活性を測定し、HD マウスにおける Trp 代謝異常の有無を調べた。HD マウスが、8 週齢まで正常に発育した後、顕著に体重

が減少し、11 週齢で HD に特徴的な舞踏運動を示した事より、8 週齢を発症前、11 週齢を発症後とし、8 週齢、11 週齢における正常型、HD 型の肝臓、腎臓における 3-HAO、ACMSD、QPRT の酵素活性を測定した。

QA 生成に関わる 3-HAO の活性は肝臓の方が腎臓よりも 7~8 倍程度高く、週齢による有意な差は観察されなかった。正常マウスと HD マウスを比較すると、両臓器、両週齢とも HD マウスで活性が上昇しており、11 週齢の肝臓においては有意 ($p < 0.05$) に上昇していた。(図 1 (a),(b).)

QA 生成を抑制する ACMSD の活性は腎臓の方が肝臓よりも高く、週齢による有意な差は観察されなかった。正常マウスと HD マウスを比較すると、両臓器、両週齢とも HD マウスで活性が低下しており、8 週齢、11 週齢の肝臓においては有意 ($p < 0.05$ (8 週齢)、 $p < 0.01$ (11 週齢)) に低下していた。(図 2 (a),(b).)

QA を消去する QPRT の活性は肝臓の方が腎臓よりも 3~4 倍程度高く、週齢による有意な差は観察されなかった。正常マウスと HD マウスの比較でも有意な差は観察されなかった。(図 3 (a),(b).)

尿中トリプトファン代謝産物の定量

肝臓における ACMSD 活性の低下と 3-HAO 活性の上昇は、血中 QA 濃度の上昇を誘引すると考えられたので、血液成分を反映する尿中の Trp 代謝産物量を測定した。8 週齢、11 週齢における正常マウス、HD マウスの尿中 AnA、XA、KA、3-HA、QA を HPLC を用いて定量し、クレアチニン量で補正を行った。(表 1)

正常マウスと HD マウスを比較すると、

AnA は 8 週齢、11 週齢ともに HD マウスで低下傾向にあり、8 週齢で有意 ($p < 0.005$) に低下していた。KA も 8 週齢、11 週齢ともに HD マウスで低下傾向にあった。QA は 8 週齢、11 週齢ともに HD マウスで上昇傾向にあり、8 週齢で有意 ($p < 0.05$) に上昇していた。XA は測定の不具合により一部データが得られなかった。3-HA は傾向性が見られなかった。

D. 考察

本研究では、HD マウス末梢組織におけるトリプトファン代謝経路の異常を発見した。特に、肝臓では、3-HAO 活性が有意に上昇し、ACMSD 活性が有意に低下した。肝臓において、ACMS 生成酵素である 3-HAO 活性の上昇と ACMS を消去する ACMSD 活性の低下が ACMS 量の増加を引き起こし、また QA を消去する QPRT 活性が変動しないことで、結果として QA 量を増加させると考察できる。実際、HD マウスの尿中トリプトファン代謝産物測定では、尿中 QA 濃度が有意に上昇しており、先の考察と一致する。抗結核薬ピラジナミド摂取やフタル酸エステル摂取による腎臓、肝臓 ACMSD 活性の低下が、尿中 QA 濃度の上昇を誘導することが報告されており^{10,11)}、ACMSD 活性の低下が QA の生成の増加に深く関わる事が推察できる。さらに、肝臓の機能として消化管から吸収された栄養に富む血液を肝門脈から受け取り、様々な栄養物の代謝や貯蔵を行うこと、尿は血液が腎臓の糸球体で濾過されたもので、血液成分の反映であるということより、末梢における ACMSD 活性の低下が血中 QA 濃度の上昇を誘導し、血液を反映する尿中の QA 濃度

が上昇したと考察できる。腎臓切除による腎機能低下ラットが、肝臓 ACMSD 活性の低下や尿中、血清中の QA 濃度の上昇を示すだけでなく、脳脊髄液、大脳皮質、小脳、海馬線条体、視床においてもキノリン酸濃度の上昇を示すという報告¹²⁾より、末梢における代謝異常が中枢のキノリン酸濃度の上昇に影響する可能性がある。

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
特になし

2. 学会発表
なし

G. 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

H. 引用文献

1. Fukuoka S, Nyaruhucha M, Shibata K. Characterization and functional expression of the cDNA encoding human brain quinolinate phosphoribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta*. **1395**, 192-201. (1998)
2. Fukuoka S, Ishiguro K, Yanagihara K, Tanabe A, Egashira Y, Sanada H, Shibata K.

- Identification and expression of a cDNA encoding human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase (ACMSD). A key enzyme for the tryptophan-niacine pathway and "quinolinate hypothesis". *J Biol Chem.* 277,35162-7. (2002)
3. Decker RH, Kang H, Leach FR, Henderson LM. Purification and properties of 3-hydroxyanthranilic acid oxidase. *J Biol Chem.* 236, 3076-82. (1961)
 4. Ichiyama A, Nakamura S, Kawai H, Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O, Senoh S. Studies on the metabolism of the benzene ring of tryptophan in mammalian tissues. II. Enzymatic formation of alpha-aminomuconic acid from 3-hydroxyanthranilic acid. *J Biol Chem.* 240, 740-9. (1965)
 5. Shibata K, Fukuwatari T, Sugimoto E. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinate phosphoribosyltransferase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 749, 81-5.(2000)
 6. Shibata K, and Onodera M. Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 143-148.(1991)
 7. Shibata, K. Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 430, 376-380.(1988)
 8. Shibata K., Onodera M. Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 974. (1992)
 9. Mawatari K, Oshida K, Iinuma F, Watanabe M. Determination of quinolinic acid by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Adv Exp Med Biol.* 398, 697-701. (1996)
 10. Fukuwatari T, Sugimoto E, Shibata K. Growth-promoting activity of pyrazinoic acid, a putative active compound of antituberculosis drug pyrazinamide, in niacin-deficient rats through the inhibition of ACMSD activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66, 1435-41. (2002)
 11. Fukuwatari T, Ohsaki S, Fukuoka S, Sasaki R, Shibata K. Phthalate esters enhance quinolinate production by inhibiting alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase (ACMSD), a key enzyme of the tryptophan pathway. *Toxicol Sci.* 81, 302-8. (2004)
 12. Saito K, Fujigaki S, Heyes MP, Shibata K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M. Mechanism of increases in L-kynurenic acid and quinolinic acid in renal insufficiency. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279:F565-72. (2000)

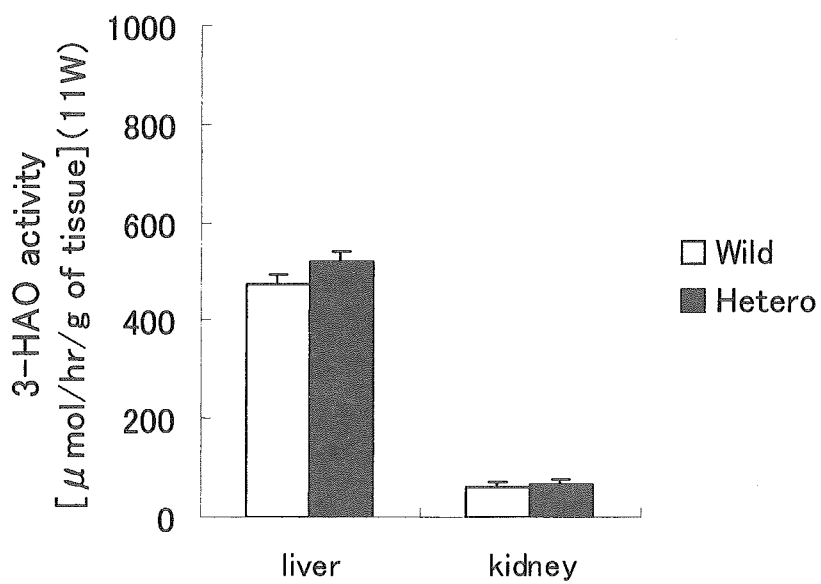
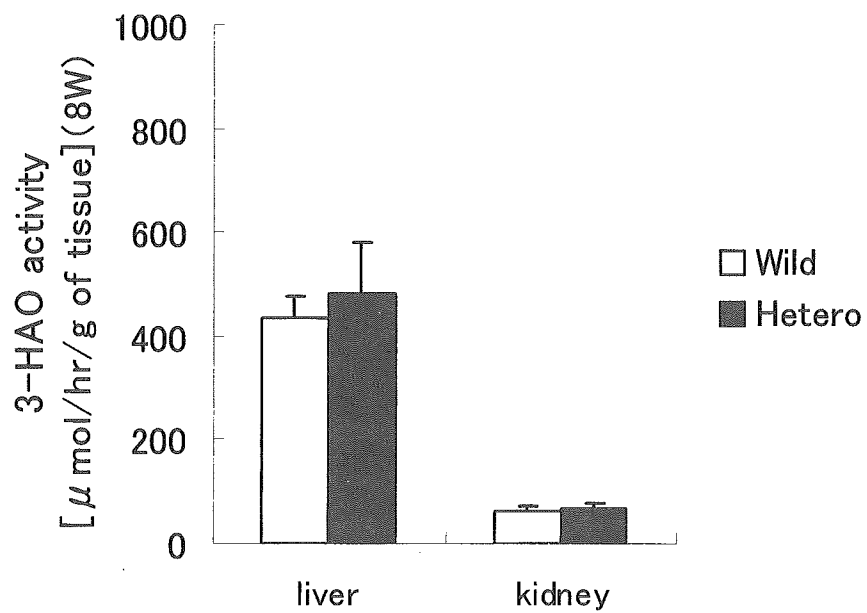


図 1. HD マウス肝臓および腎臓における 3-HAO 活性

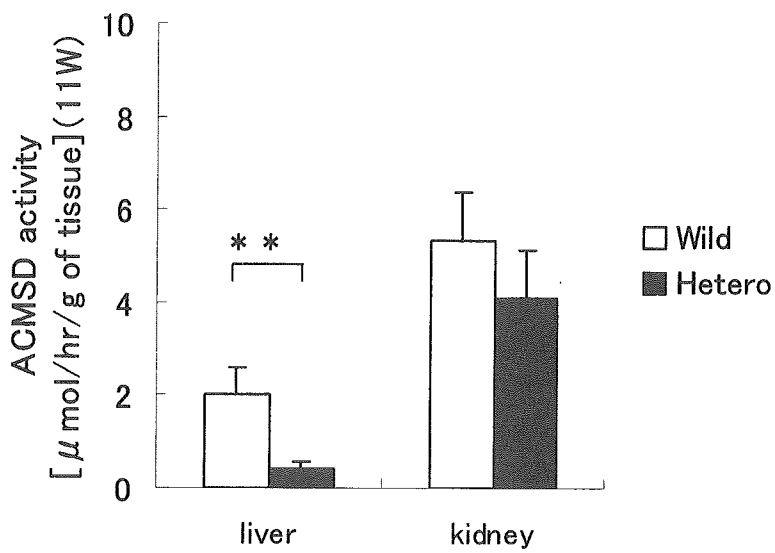
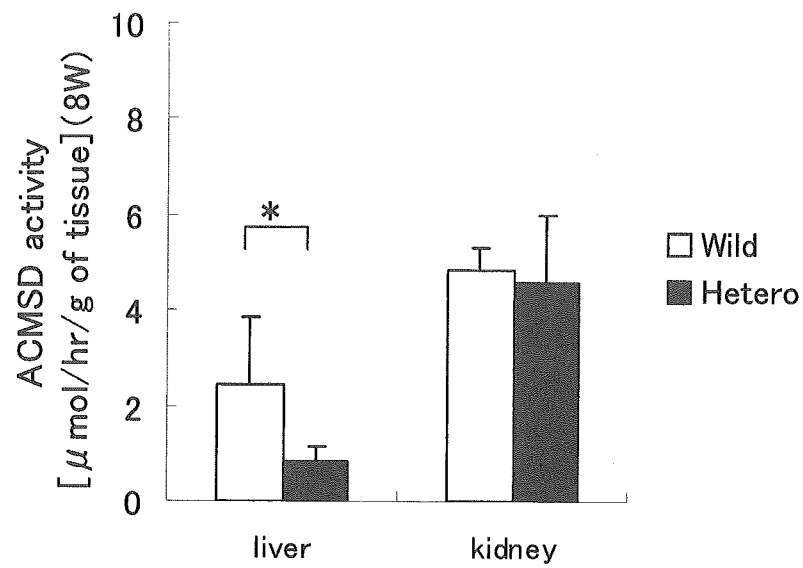


図2 HD マウス肝臓および腎臓における ACMSD 活性
 野生型 (Wild type) に比べ有意差有り (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

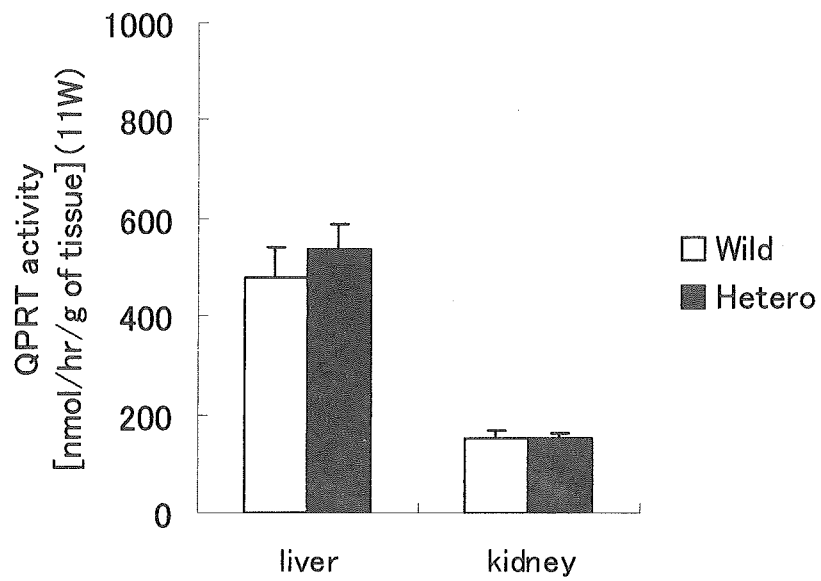
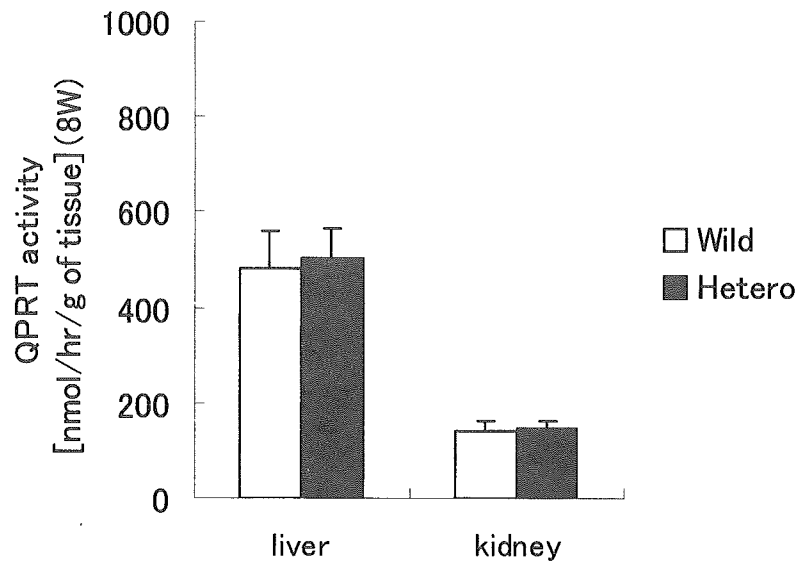


図3 HD マウス肝臓および腎臓における QPRT 活性

表1 HD マウスにおける尿中トリプトファン代謝産物の比較

AnA ; アンスラニル酸, XA ; キサンツレン酸, KA ; キヌレン酸, 3-HA ; 3-ヒドロキシアン
スラニル酸, 値は平均値±標準偏差で表した。

野生型 (Wild type)に比べ有意差有り (* p<0.05 ** p<0.01)

Urinary excretion/mg creatinine	8W		11W	
	Wild	Hetero	Wild	Hetero
AnA	20.3 ± 4.5	14.6 ± 4.2	17.3 ± 3.7	10.2 ± 0.0
XA	467.0 ± 58.2	454.7 ± 102.2	378.7 ± 18.9	N/A
KA	106.7 ± 23.6	96.9 ± 19.5	92.2 ± 15.1	80.1 ± 14.4
3-HA	668.3 ± 272.5	640.2 ± 247.1	536.4 ± 96.5	630.1 ± 217.1
QA	35.9 ± 9.6	49.7 ± 19.0	52.8 ± 7.5	56.6 ± 11.4

Values are shown as means±SD.

平成 17 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

3. α -Tocopherol Transfer Protein (α -TTP) 遺伝子発現調節機構の解析

— 乳汁中ビタミン E 含有量の調節機構について —

分担研究者 玉井浩 大阪医科大学小児科 教授

研究要旨

α -Tocopherol Transfer Protein (α -TTP) はビタミン E 同族体の中で α -Tocopherol (α -Toc) を特異的に認識し、肝臓細胞内で選択的に輸送して血中 α -Toc 濃度を調節する働きをする。また、 α -TTP は肝臓細胞内だけに存在するとは限らず、脳、子宮、胎盤（脱落膜）、白血球などにもその遺伝子は発現している。しかし、肝臓以外の組織での α -TTP の役割はあまり解明されていない。乳腺細胞培養系の実験結果から、 α -Tocopherol においてのみ α -TTP 遺伝子の発現上昇を認めた。したがって、母乳中 α -Tocopherol 濃度を決定する因子として、 α -TTP 遺伝子の発現調節が考えられた。

A. 目的

α -Tocopherol Transfer Protein (α -TTP)はビタミン E 同族体の中で α -Tocopherol (α -Toc) を特異的に認識し、肝臓細胞内で選択的に輸送して血中 α -Toc 濃度を調節する働きをする。また、 α -TTP は肝臓細胞内だけに存在するとは限らず、脳、子宮、胎盤(脱落膜)、白血球などにもその遺伝子は発現している。しかし、肝臓以外の組織での α -TTP の役割はあまり解明されていない。本研究では、 α -TTP の機能を明らかにすることを目的として実験を行った。

α -TTP 遺伝子欠損マウスの解析において現在までに分かっていることを下記に示す。

①雌の避妊

Trophoblast の形成不全と妊娠の中絶に関与すること、つまり α -TTP +/+ 胎仔を α -TTP 遺伝子欠損マウスに移植しても妊娠を継続できないことが分かっている。

②妊娠子宮での発現の上昇

α -TTP は性交後 4.5 日に一過性に上昇するが、これは α -TTP が着床や胎仔に対して重要な働きをしている。

B. 実験方法

1. 培養細胞系実験

<Ishikawa cell(子宮内膜腺癌細胞)を用いて実験を行った>

- ① ホルモン 妊娠初期に子宮での α -TTP の発現が上昇することから妊娠中に増加する estrogen(10^{-7} M;妊娠後期に認める妊娠期間の最高値)、progesterone(4 μ M ; 妊娠後期に認める妊娠期間の最高

値)を添加した。

- ② 成長因子 EGF 100ng/ml

- ③ Vit.E α -tocopherol 10^{-5} M を添加し、 α -TTP 遺伝子を検討した。

<実験方法>

Ishikawa cell : 37°C、5% CO₂ の条件の下、培地に 10%FBS+penicillin-streptomycin を加えた DMEM を使用した。75cm² フラスコにて confluence になったところで培地は charcoal 処理した 10%FBS + penicillin-streptomycin を加えた phenol red free の DMEM の培地に変えて細胞数 10^4 /mL として一日おいた後に添加実験を行った。TTP 遺伝子発現の検討法としてこれらの細胞より RNA を抽出し RT-PCR にて行った (TTP/ β -actin)。

<乳腺細胞を用いた実験>

乳汁中に Vit.E が含まれることより乳腺細胞において α -TTP 遺伝子が発現している MCF-7(乳腺癌)を用いた。また、正常に近い細胞 MCF-10 (乳腺繊維嚢胞から樹立) も用いた。これら乳腺細胞について検討を加えている。

C. 結果

α -tocopherol においてのみ α -TTP 遺伝子の発現上昇を認めた。

D. 考察

基質である α -tocopherol によって α -TTP 遺伝子の発現調節が行われているが、子宮内膜細胞と同様に、estrogen などのホルモンの影響を受けることが予想され乳腺細胞で

肝財細胞内と同様に α -TTP 遺伝子の発現が調節されているとすれば、母乳中 α -tocopherol 濃度を決定する因子となりえる。

今後は、 α -TTP 遺伝子上流部分を解析し、発現を調節する

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

特になし

2. 学会発表

なし

G. 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

平成 17 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

4. 大腿骨頸部骨折患者における脂溶性ビタミン（ビタミン D, ビタミン K）欠乏に関する検討

分担研究者 田中清 京都女子大学 教授
研究協力者 木戸詔子 京都女子大学 教授

研究要旨

大腿骨頸部骨折は、骨粗鬆症に伴う骨折としては最も重篤なもので、受傷後の死亡率が高く、また日常生活レベルが確実に低下する。したがって骨折が起こってから治療するのでは不十分であり、予防することが重要である。本研究では、大腿骨頸部骨折発生における栄養の意義を明らかにする目的で、大腿骨頸部骨折患者から、受傷直後に採血を行い、血清ビタミン D・K 濃度を測定した。年齢を揃えた、近接の老人ホーム入所者を非骨折対照群とした。対照群に比して、骨折群では男女を問わず、血清アルブミン・フィロキノン(PK)・メナキノ-7 (MK-7) 濃度が低く、女性では 25(OH)D 濃度が低かった。ロジスティック回帰の結果、アルブミン・PK・25(OH)D 濃度の上昇は、骨折の Odds 比を著しく低下させることが示された。また主成分分析を行ったところ、PK・MK-4 は、一般栄養状態を反映する第 1 主成分との関連が低かった。

今回のデータは、受傷直後の採血から得られたものであり、おそらく患者の受傷前の栄養状態を反映しているものと考えられた。すなわちビタミン D・K の不足は、大腿骨頸部骨折の危険因子としての意義を有することが示唆された。

A. 目的

骨粗鬆症は“A disease characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue leading to enhanced bone fragility and consequent increase in fracture risk”, すなわち「骨粗鬆症とは、骨量の低下と、骨の微細構造の劣化を特徴とする疾患であり、そのために骨折の危険が増した状態」と定義されている。ここで重要なことは、「骨折したもの」ではなく、「骨折の危険が増した状態」それ自身が病気であり、治療対象であると述べている点である。この考え方は、表1に示すように、現在無症状でも虚血性心疾患を予防するために血清コレステロールを管理する必要があるという考え方と全く同じであり、骨粗鬆症を成人病・生活習慣病として理解する必要がある¹⁾。

骨粗鬆症において骨折しやすい部位として、特に椎体圧迫骨折・大腿骨頸部骨折・橈骨遠位端骨折の頻度が高い。このうち大腿骨頸部骨折は、表2に示すように、受傷後の死亡率が高いだけでなく、独居者が施設に入らざるを得なくなったり、介護を要するようになったり、ほとんどの例で生活レベルが低下するなど、患者本人にとって重大であるだけでなく、医療費・介護費用を考えると、社会にとっても大きな問題である²⁾。すなわち骨粗鬆症に伴う骨折は、骨折してから治療するのではなく、予防に重点をおかねばならない。

骨の栄養というと、巷間ではしっかりカルシウムを摂取しましょうという論調のものが多いが、これだけでは不十分である。いうまでもなく、ビタミンDは小腸におけるカルシウム吸収を促進し、ビタミンD欠乏状態では、いくらカルシウムを摂取しても、十分吸収されない。すなわち、ビタミンDを抜きにして、カルシウム摂取のみを論じる骨の栄養

学はきわめて片手落ちである。またビタミンKの生体内での役割に関しては、現在の摂取基準においては、肝臓における凝固因子の活性化のみが考慮されているが、近年骨粗鬆症の分野では、ビタミンKは骨においても重要な栄養素であることを示す報告が行われている。そこで本研究においては、骨粗鬆症に伴う骨折の中では最も重篤なものである、大腿骨頸部骨折患者を対象として、これら脂溶性ビタミンの欠乏症調査を行った。

B. 研究方法

1. 調査対象

対象は、大腿骨頸部骨折のため公立玉名中央病院を受診した、大腿骨頸部骨折患者男性27名、女性72名であり、平均年齢は男性82.6歳、女性85.5歳であった。ほとんどの例において、受傷後24時間以内に採血を行った。また非骨折の対照群として、近接の老人ホーム入所者より採血を行い、年齢は骨折群とほぼ一致させた。

2. 調査内容

一般状態を表す指標として、アルブミン、総コレステロール、血清尿素窒素(BUN)、GOT、GPT、ヘモグロビン濃度を測定した。

ビタミンD関連では、25水酸化ビタミンD [25(OH)D]、及びビタミンD欠乏の鋭敏な指標として、血清副甲状腺ホルモン(PTH)を、intact PTHにて評価した。

ビタミンK関連では、Phylloquinone [PK]、Menaquinones [MK-4, MK-7]、及び骨におけるビタミンK欠乏の指標として、Undercarboxylated osteocalcin [ucOC]を測定した。

統計処理は、SPSS 13.0Jを用いた。

C. 結果

得られた結果を表3に示す。まず一般栄養