

图 8. 尿中 4-PIC 排泄量

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

9. 標準飼料摂取下における若齢および成熟ラットのビタミン B₆ 栄養について

分担研究者 早川享志 岐阜大学 教授
研究協力者 三嶋智之 岐阜大学 特別協力研究員

研究要旨

ビタミン B₆ (B₆) の食事摂取基準は、6-11 か月の乳幼児では 0-5 か月の乳幼児の AI と成人の食事摂取基準からの外挿値の平均値として求められているが、両者の値には大きな隔たりがある。B₆ の食事摂取基準は、たんぱく質あたりの B₆ 必要量をもとに算定されているが、一般に成長期では成熟期よりもたんぱく質の必要量が高い。成長期においては、成熟期に比べてたんぱく質の同化による利用が大きく、異化は成熟期に比べて少ない。従って、若齢期における B₆ の必要量は、たんぱく質摂取量あたりで求めた値では、余剰である可能性がある。そこで、本研究においては、4 週齢の若齢ラットと 20 週齢の成熟ラットをそれぞれ成長期と成熟期と考え、それらラットに標準飼料（たんぱく質含量 20%）を摂取させた場合の B₆ 栄養状態について評価することにより、成長期と成熟期のたんぱく質代謝状況の違いが B₆ 栄養状態に影響を及ぼすか否かについて検討することを目的とした。その結果、標準飼料（たんぱく質摂取量あたりの B₆ 摂取量は同じとなる）を摂取したラットの場合、B₆ 栄養状態の指標である血漿ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) レベルや肝臓中 B₆ レベルは、若齢と成熟ラット間では差はなかったが、クレアチニン当たりの 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) 排泄量は、若齢ラットの方が有意に高くなっていった。しかし、クレアチニン排泄量は成熟ラットでは高まっていたので、クレアチニンあたりでの算出結果を指標として用いることは適切ではないと判断された。そこで、100g 体重・1 日あたりの尿中 B₆ 排泄量あるいは 4-PIC 排泄量として求めたところ若齢ラットでは排泄量が高い様相がみられた。一方 B₆ 摂取量 1 mg あたりの尿中 B₆ 排泄量は、成熟ラットで高く、逆に尿中 4-PIC 排泄量は若齢ラットで高かった。尿中 4-PIC と B₆ を合計した尿中の B₆ 化合物排泄量は、有意ではないが若齢ラットで高い傾向にあった。一般に 4-PIC は余剰な B₆ が代謝されて排泄される排泄型の B₆ 化合物であるので、若齢ラットにおいては、B₆ が余剰な状況を示唆する結果ではないかと考えられた。

A. 目的

ビタミン B₆ (B₆) の食事摂取基準は、6-11 ヶ月乳幼児では、0-5 ヶ月乳幼児からの外挿値と大人からの外挿値の平均値として求められているが、両者の値は隔たっている。このように B₆ の食事摂取基準はまだ未確定な部分が残されている。現在 B₆ の食事摂取基準は、たんぱく質摂取量あたりで策定されているが、たんぱく質の生体における利用状況も影響すると考えられる。例えば、成長期においては、同化による利用が多く、異化代謝の割合は少なく、成熟期においては逆となっている。つまり、成熟期においては、異化代謝が盛んであり、その分 B₆ の必要量も高いのではないかと考えられる。一般に B₆ の必要量は、たんぱく質摂取量が増すと増加する¹⁾ という報告がたんぱく質摂取量あたりで B₆ の食事摂取基準を策定する根拠となっているが、基になっている条件は成人について得られたデータである。従って成長期と成熟期でのたんぱく質代謝状況の違いが B₆ の必要量にも影響を及ぼす可能性が考えられる。すなわち同じたんぱく質摂取レベルにおいて必要とされる B₆ 必要量に違いがある可能性があるのではないかとということである。

B₆ の栄養評価は、中長期的には血漿中ピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) レベルにより判定される²⁾。一方、余剰な B₆ は尿中に排泄され、一部は 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) として排泄される³⁾。従って、体内 B₆ 栄養指標として血漿中 PLP レベルを、B₆ の代謝指標として尿中 B₆ 関連物質排泄量を測定することにより B₆ 栄養状態の比較が可能ではないかと考え、週齢の異なるラットに標準飼料 (飼料中たんぱく質含量 20%) を摂取させた場合の B₆ 代謝状況について調べることにより成長期と成熟期でのたんぱく質代謝状態の違いが B₆ 必要量に影響を及ぼすか否かについて検討することを目的として、若齢ラットと成熟ラットにおける栄養状態について検討を行った。

B. 実験方法

1. 動物実験法

実験動物は Wistar/ST 系 Clean 雄ラットを日本エスエルシー株式会社より購入した。ラットは購入後予備飼育に用いるまでポリカーボネート製のケージで飼育 (飼料: オリエンタル酵母工業株式会社製 MF 食) 後、実験に使用した。飼育室の温度は 23±1°C に設定し、

明暗 12 時間サイクル (6:00~18:00) とした。

予備飼育には AIN-76 標準飼料を用い、本飼育においてはビタミンフリーカゼインを用いた同組成の飼料を与えた。飼料組成は表 1 に示した。飼料成分であるビタミンフリーカゼイン、AIN-76 ミネラル混合、セルロースパウダーはオリエンタル酵母工業株式会社より、重酒石酸コリンは和光純薬工業株式会社より、酢酸レチノールは Sigma Chemical Co. より、その他はすべてナカライテスク株式会社より購入した。

ラットは 5 連の個別ケージに入れ、実験環境に慣らすために AIN-76 標準飼料で 3 日間予備飼育した。予備飼育後、4 週齢のラットを若齢群、20 週齢のラットを成熟群とし、各群 7 匹からなる 2 群を設けた。各群に実験飼料を与え、28 日間飼育した。飼育期間中、飲料水 (水道水)、実験飼料は自由摂取とし、毎日体重と飼料摂取量を測定した。飼育開始 4 週目に 24 時間尿を採取し、分析まで -20°C で保存した。尿については尿量、クレアチニン量および 4-PIC 量および総 B₆ 量の測定に供した。

本飼育開始から 29 日目にエーテル麻酔下で解剖を行った。開腹後、採血は 1%ヘパリン Na 処理したシリンジと注射針を用いて腹部大動脈より行った。採取した血液は 15 分間遠心分離 (1,500×g, 4°C) し、血漿サンプルを得た。また、摘出した肝臓は重量を測定後、血漿サンプルとともに分析まで -20°C で凍結保存した。

2. 血漿および肝臓中 B₆ ビタマーおよび尿中 4-PIC の分析

血漿 PLP および肝臓中の PLP とピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) は柘植らの方法⁴⁾ に従い HPLC により分析した。PLP については、抽出液をシアン化カリウム (KCN) 処理により 4-ピリドキシン酸 5'-リン酸 (4-PIC-P) に変換後高感度で分析する柘植の方法⁵⁾ を用いた。尿中の 4-PIC は、Gregory と Kirk の方法³⁾ により分析した。

3. 微生物定量法による尿中 B₆ 量の測定

4 週目に回収した尿は、1500×g, 4°C で 10 分間遠心分離しその上清を -20°C で保存した。この尿サンプルは 0.055 M HCl 下 121°C で 4 時間オートクレーブすることにより加水分解処理を行い pH 5.0 に調整したものを

Saccharomyces cerevisiae 4228 (ATCC 9080) を使用した微生物定量法に供した⁶⁾。

4. その他の分析法

尿中クレアチニンは、Wehstein と Gudaitis の方法⁷⁾により分析した。

5. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差 (SE) 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

実験期間中の最終体重、体重増加量、総飼料摂取量、飼料効率を表 2 に示した。最終体重、総飼料摂取量は成熟群に比べ若齢群で有意に低値となった。体重増加量は若齢群で有意に高く、成熟群の体重増加量は小さかった。

血漿 PLP 濃度を図 1 に、肝臓 PLP および PMP 含量を図 2 示した。何れも、殆ど差はみられなかった。クレアチニンあたりの尿中 B₆ 排泄量および尿中 4-PIC 排泄量を図 3 および図 4 に示した。B₆ 排泄量は若齢群の値が高かったが、有意な差は見られなかった。一方、4-PIC 排泄量は、若齢群では有意に高値を示した。体重 100g、1 日当たりの尿総 B₆ 排泄量および尿中 4-PIC 排泄量を図 5 および図 6 に示した。両者とも若齢群で高かったが、有意差はみられなかった。次に B₆ 摂取量 1mg あたりの尿総 B₆ 排泄量および尿中 4-PIC 排泄量を図 7 および図 8 に示した。尿 B₆ 排泄量は成熟群で高い値を示したが、有意な差はなかった。B₆ 摂取量 1mg あたりの尿中 4-PIC 排泄量は若齢群で有意に高かった。B₆ 摂取量 1mg あたりの尿総 B₆ および尿中 4-PIC 排泄量の合計については、若齢群で高かったが、有意な差はなかった。

D. 考察

B₆ の食事摂取基準は、たんぱく質摂取量当たりで算定されている⁸⁾。今回用いた飼料は、カゼイン含量が 20% の通常のレベルでたんぱく質に対する B₆ の摂取比率は若齢群と成熟群では同じである。B₆ の要求性は、摂取するたんぱく質の量に依存している⁹⁾ことが示されているが、今回は同じたんぱく質レベルであるので、若齢群と成熟群の B₆ 栄養状態の違いは、両群における B₆ 必要量に应答すると考えられる。今回の実験においては、血漿中 PLP 濃度も、肝臓中 PLP および PMP 含

量に違いは見られなかったが、尿中への排泄状況には若干の違いが認められた。クレアチニンあたりでの 4-PIC 排泄量は、若齢群で有意に高かった。しかし、クレアチニン排泄量自体が成熟ラットでは高くなっていることから、クレアチニンあたりの指標は適切ではないと判断した。そこで、100g 体重、1 日あたりの排泄量としての B₆ および 4-PIC を評価した場合、若齢群で値は高かったが、有意な差ではなかった。一方、B₆ 摂取量 1mg あたりでは、B₆ 排泄量は、成熟群で高かったが有意差は見られなかった。しかし、この場合の 4-PIC 排泄量は、若齢群で有意に高値を示した。両者を合わせると、若齢群の排泄量が高い様相であったが、有意な差ではなかった。一般に 4-PIC は短期的な B₆ 摂取量を反映するといわれており、長期的な B₆ 栄養状態を反映する PLP とは指標としての意味は異なるが、今回の結果からは、若齢群において B₆ の排泄が高くなっていると考えられた。

今回の実験においては、ラットの体重に違いがあるため、尿への B₆ および 4-PIC 排泄量は、クレアチニンあたりで表すことには問題があると判断した。その代わり、100g 体重・1 日あたり、あるいは、mg PN eq. で考えた。これによると若齢群では、尿への B₆ 排泄量は、クレアチニンの影響は受けずに評価が可能であると思われた。

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) Okada M, Shibuya M, Akazawa T, Muya H, Murakami Y Dietary protein as a factor affecting vitamin B₆ requirement. *J Nutr Sci Vitaminol*, 44,37-45. (1997)

- 2) Lumeng L, Ryan PM, Li T Validation of the diagnostic value of plasma pyridoxal 5'-phosphate measurements in vitamin B₆ nutrition of the rat. *J Nutr*, 108, 545-553. (1978)
- 3) Gregory FJ, Kirk RJ Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*, 32, 879-883. (1979)
- 4) Tsuge H, Oda T, Miyata H Separation and determination of vitamin B₆ derivatives by reversed-phase HPLC. *Agric Biol Chem*, 50, 195-197. (1986)
- 5) Tsuge H, Toukairin-Oda T, Shoji T, Sakamoto E, Mori M, Suda H Fluorescence enhancement of PLP for application to HPLC. *Agric Boil Chem*, 52, 1083-1086. (1988)
- 6) 柘植治人, 早川享志: 第4章水溶性ビタミン4.5 ビタミンB₆(分担)“新・食品分析法”日本食品科学工学会食品分析法編集委員会編, 光琳 394-406, 1996.
- 7) Wachstein M, Gudaitis A Disturbance of vitamin B₆ metabolism in pregnancy. (II) The influence of various amounts of pyridoxine-hydrochloride upon the abnormal tryptophan-load test. *J Lab Clin Med*, 42, 98-107. (1953)
- 8) Institute of Medicine Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. (1998) Washington, DC: National Academy Press.
- 9) Hansen CM, Leklem JE, Miller LT Vitamin B-6 status of women with a constant intake of vitamin B-6 changes with three levels of dietary protein. *J Nutr*, 126, 1891-1901. (1996)

表 1. AIN-76標準飼料組成

Ingredients	AIN-76 diet	Experimental diet
	(%)	(%)
Casein	20.0	—
Vitamin-free casein	—	20.0
Soybean oil	5.0	5.0
Sucrose	50.0	50.0
Cellulose powder	5.0	5.0
AIN-76 vitamin mixture	1.0	1.0
AIN-76 mineral mixture	3.5	3.5
DL-Methionine	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2
α -Cornstarch	15.0	15.0

表 2. 終体重, 体重増加量, 総飼料摂取量および飼料効率

	Young	Adult
Final body weight (g)	289 \pm 7	491 \pm 6*
Body weight gain (g)	180 \pm 6	49 \pm 5*
Total food intake (g)	458 \pm 14	506 \pm 9*
Feed efficiency	0.394 \pm 0.005	0.097 \pm 0.010*

Values are means \pm SE (n=8).

* Significantly different from the Young group at $P < 0.05$.

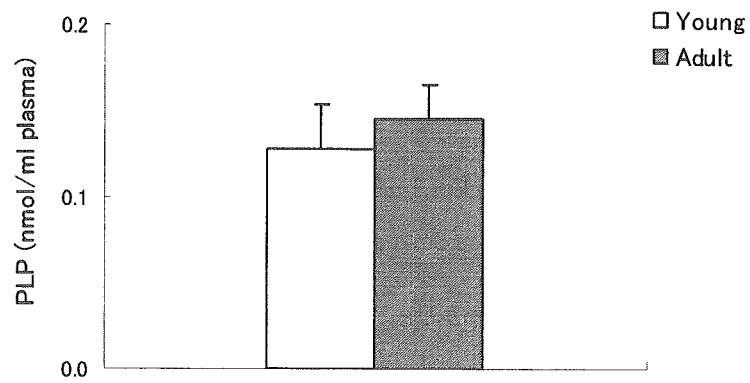


図 1. 血漿 PLP 濃度

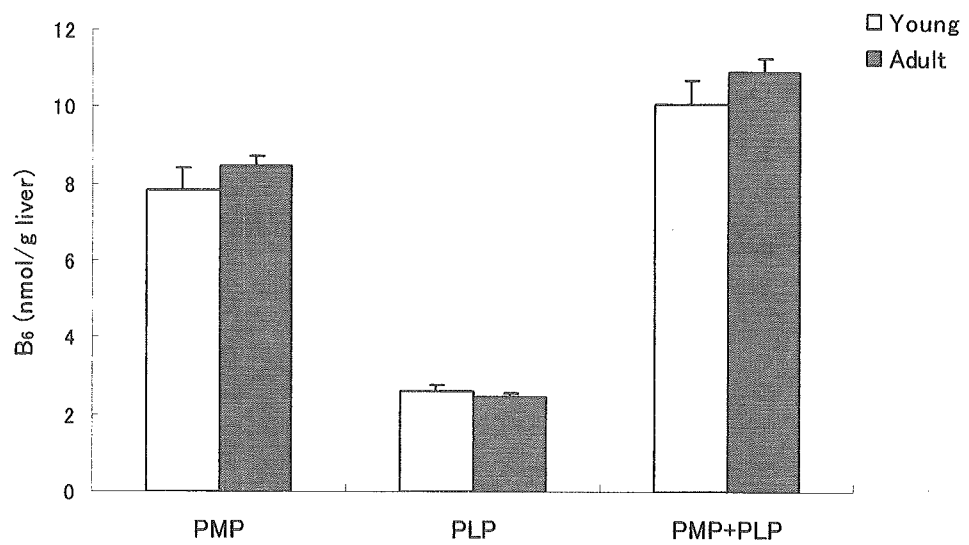


図 2. 肝臓 PMP および PLP 含量

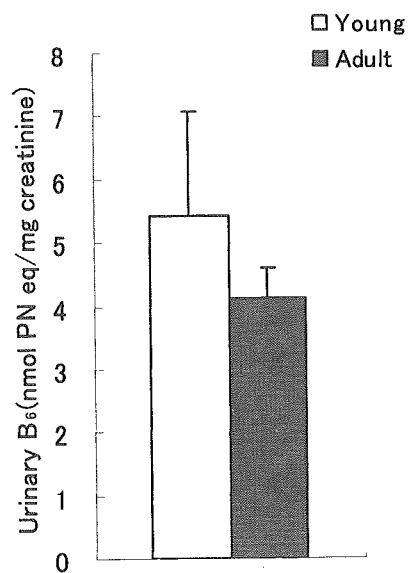


図3. クレアチニン1mgあたりの尿中B₆排泄量

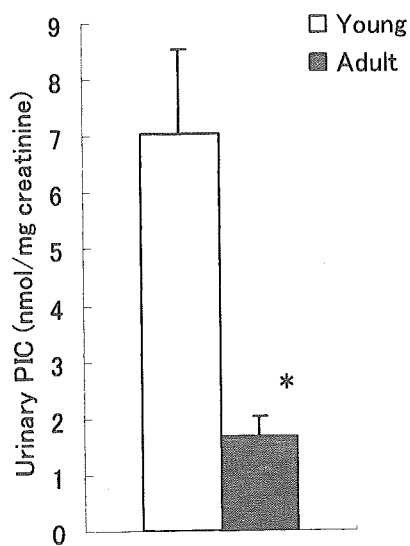


図4. クレアチニン1mgあたりの尿中4-ピリドキシニン酸 (PIC) 排泄量

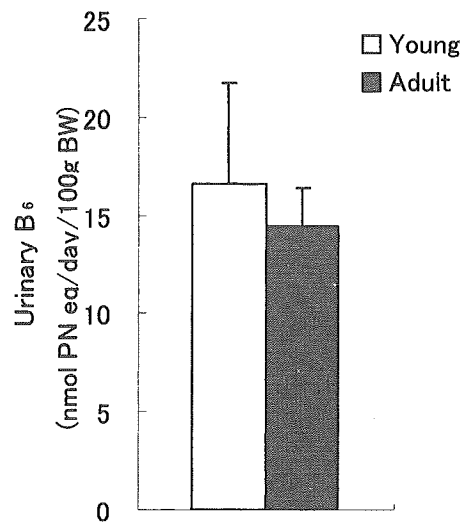


図 5. 体重 100 g, 1 日あたりの尿中 B₆ 酸排泄量

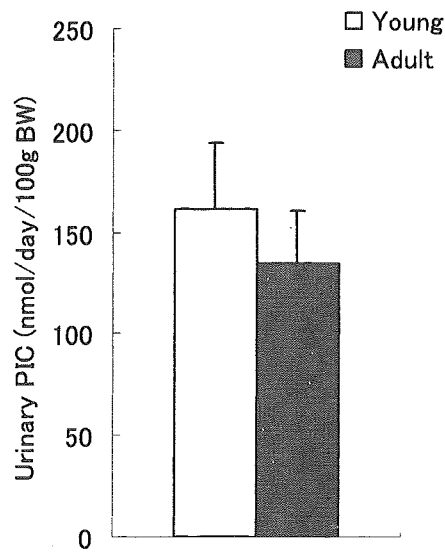


図 6. 100 g 体重, 1 日あたりの尿中 4-ピリドキシン酸排泄量

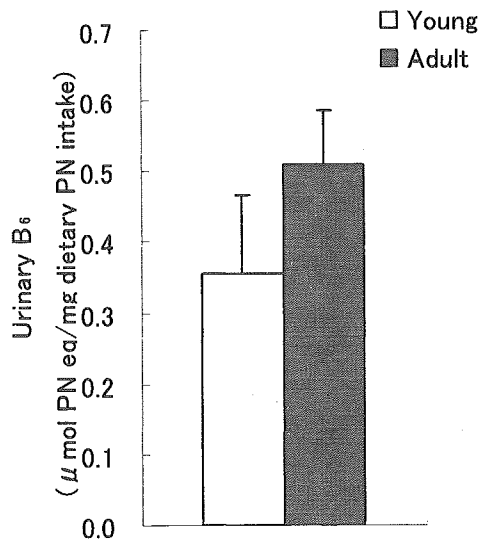


図7. B₆摂取量1mgあたりの尿中B₆排泄量

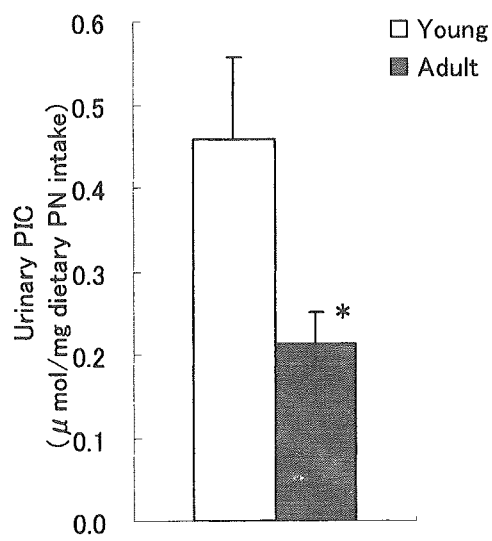


図8. B₆摂取量1mgあたりの尿中4-ピリドキシン酸排泄量

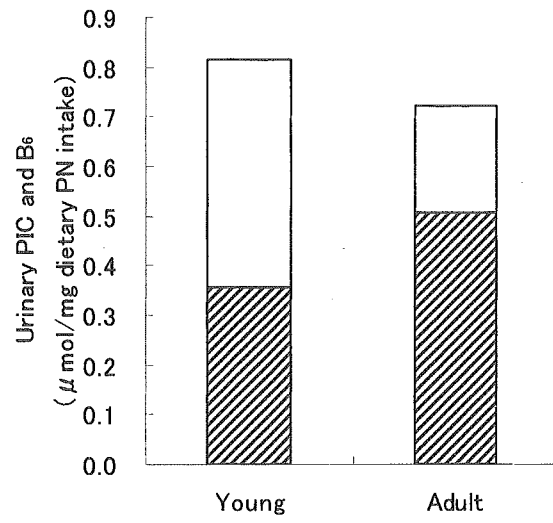


図9. B₆摂取量1mgあたりの尿中4-ピリドキシニン酸とB₆排泄量
(Hatched bar: Urinary B₆, Open bar: Urinary PIC)

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

10. ビオチン欠乏状態における 3-hydroxyisovaleric acid の新規な指標としての有用性についての検討

分担協力者 渡邊敏明 兵庫県立大学 教授
研究協力者 榎原周平 兵庫県立大学 助手
研究協力者 福井徹 病体生理研究所 室長

研究要旨

3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-hydroxyisovaleric acid, 3-HIA) がビオチンの早期欠乏指標として注目されている。とくに妊娠前期から後期にかけて妊婦の尿中への排泄量が増加している。しかし、妊娠全期間を通じて、どの期間でどのように変動しているかに関してはまだ不明である。そこで本研究では、尿中 3-HIA がビオチン欠乏を鋭敏に示す指標として有用であるかどうかを検討した。尿中 3-HIA 量は妊娠 8 ヶ月をピークに増加した後、出産後 1 ヶ月かけて低下した。一方、尿中ビオチン量は妊娠 8 ヶ月に減少している。また、差は見られないものの、妊娠 8 ヶ月から産後 1 ヶ月にかけて 12 人中 10 人の尿中ビオチン量が増加している。このことから、妊娠 8 ヶ月の段階で最も体内のビオチン不足が引き起こされることが推察される。尿中ビオチン量が妊娠 8 ヶ月にかけて減少すると同時に尿中 3-HIA は 8 ヶ月にかけて上がっていることから、ヒトの妊娠においてもビオチンの栄養状態を示す指標として有用であることが示唆される。

A. 目的

1. ビオチンとは

ビオチンは、ビタミンB群に分類される水溶性ビタミンの一つである。2つの5員環の結合がシス配位しており、ウレイド環を構成する6個の原子(C,N,O)は同一平面上にあり、環状部分は舟型をしている(Fig. 1)。生理作用としては、カルボキシラーゼの補酵素として炭酸固定反応に関与し、糖新生、脂肪酸やアミノ酸の合成、エネルギー代謝において重要な役割を果たしている¹⁾。このためビオチンが欠乏すると皮膚炎や脱毛といった症状が現れることが報告されている²⁾。また、カルボキシラーゼの低下によって、尿中に有機酸が排泄されることも知られている。例として、生後5ヶ月の幼児がビオチン欠乏により、尿中に3-Hydroxyisovaleric acid(3-HIA)やβ-メチルクロトニルグリシンが尿中に排出され、アシドーシスやケトーシスといった酸血症を発症し、ビオチン補給をすることでその症状が消えることが報告されている³⁾。

2. ビオチン欠乏

ビオチンは、卵白を多量に摂取すると、卵白中のアビジンと呼ばれる糖タンパク質がビオチンと結合して吸収を阻害したり²⁾、抗生物質を摂取することでビオチン合成を行う腸内細菌の減少により欠乏することが報告されている。しかし、ビオチンは食品に広く分布しており、また腸内細菌によって産生されているため、一般的にビオチン欠乏状態になることは稀である²⁾。

近年、欠乏症状は見られないものの、体内に十分なビオチンが充足されないビオチン不足が問題になっている。偏った食生活に加え、抗けいれん治療⁴⁾や妊娠^{5,6)}、喫煙⁷⁾などによってビオチン不足に陥ると言われている。特に妊娠中にビオチン不足を起こすと、母親には脱毛や皮膚炎といったビオチン欠乏症状を示さない⁸⁾が、いくつかの動物種では催奇形性を起こすことが報告されている⁹⁾。このようなことから、ビオチン不足を回避するためには、鋭敏なビオチン栄養指標が必要である。

3. 3-HIAとは

3-HIAは、ビオチンが関与している4つのカルボキシラーゼのうち、ロイシンの異化作用に関与しているβ-メチルクロトニル CoAカルボキシラーゼ(MCC)の活性がビオチン欠乏により低下することで尿中に排泄される有機酸である。他の栄養状態の指標と言わ

れている血漿中のビオチン量や、同じく尿中有機酸である3-hydroxyisopropionic acidやMethylcitric acidはビオチン欠乏状態とコントロールと比較しても体内の栄養状態を判断する指標として十分でない。よって、3-HIAが潜在型ビオチン欠乏を早期に判断できる指標として有用であることをMockらは報告している^{10,11)}。

4. 現状および問題点

Mockらの研究で使用されているガスクロマトグラフ質量分析装置(GC/MS)による測定法¹²⁾は、前処理が煩雑な上に、高価な機器を要するために汎用性が低く、この研究以外の報告例が少なく、十分な検討がなされているとはいえない。そこでこれまでに、前処理が簡素で汎用性の高い高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いて尿中3-HIA量の測定法を開発し、ビオチン欠乏マウスを用いた3-HIAとビオチンとの関連について基礎的検討を行ってきた^{13,14,15)}。

しかし、ビオチン欠乏時における尿中ビオチンと3-HIA、欠乏症との関連や、ヒト妊婦における3-HIAとビオチン動態に関してはまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究では、尿中3-HIAがビオチン欠乏を鋭敏に示す指標として有用であるかどうかを検討した。

B. 実験方法

1. 材料と方法

1) 調査対象

2004年3月～2005年2月にかけて杉山産婦人科(東京都)に通院していた妊娠女性12名に協力してもらった。被験者の条件として、以下の項目についてアンケートを行い、全ての項目に該当する人を対象にした。

- ・精神的、肉体的に健康であること。
- ・偏食がなく、規則正しい生活を行っていること。
- ・採尿前日には飲酒、喫煙、ミネラル剤、ビタミン剤は差し控えられること。

2) 採尿方法

被験者には、該当月の来院時に中間尿を紙コップにて採取してもらった。採尿後、サンプルは測定時まで-40℃下で冷凍保存した(Fig. 5)。

3) 倫理事項

本実験を行うにあたり、被験者には事前にインフォームドコンセントを行い、また大阪府立大学倫理委員会の承認を得て、個人情報

などや倫理に関係した事項を遵守した上で行った。

2. 分析方法

1) 尿中ビオチン

乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) を用いたバイオアッセイで測定した。

2) 尿中 3-HIA

有機酸分析システム法の原理

有機酸分析システム HPLC は分析対象成分が引き起こすイオン量の変化を測定することで、イオン性の物質を選択的に検出することができる電気伝導度検出と、有機酸を分離するのに適しているといわれているイオン排除クロマトグラフを組み合わせた HPLC である^{16,17)}。しかし、移動相に強酸水溶液 (p-トルエンスルホン酸水溶液) を用いるために、有機酸の脱離が抑制され、感度の低下が引き起こされる。そこで、アルカリ緩衝溶液をカラムの溶出液と混合させて pH を緩衝させることにより、有機酸検出の感度を向上させている^{18,19)}。この方法により、夾雑成分のために面倒な前処理を必要としていた試料でも、希釈やろ過といった簡単な処理だけで分析が可能になるという利点がある。

3) サンプル前処理方法

尿は 0.45 μ m マイクロフィルター Minisart RC4 (sartorius(株), 東京) でろ過したものを使用した。

4) 使用装置

この方法は、(株)島津製作所(京都)の「有機酸分析システム」専用の HPLC を使用している。使用装置については以下の通りである (Fig. 6)。

システムコントローラ : SCL-10A_{vp}

ポンプ : LC-10AD_{vp}

電気伝導度検出器 : CDD-6A

カラムオーブン : CTO-10AC_{vp}

オートサンプラー : SIL-10AD_{vp}

クロマトデータ処理 : CLASS-VP ワークステーション

5) 分析条件

本実験の分析条件については以下の通りである。

使用カラム : Shim-pack SPR-H,

およびガードカラム SPR-H(G)

(どちらも(株)島津製作所, 京都)

移動相 : 4mM p-トルエンスルホン酸水溶液

緩衝液 : 4mM p-トルエンスルホン酸,

および 100 μ M EDTA を含む 16mM Bis-Tris 水溶液

流速 : 0.8ml/min. (移動相, 緩衝液)

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

6) 尿中クレアチニン

Jaffe 法を原理としたクレアチニン・テストワコー(株和光純薬, 大阪)を用いてクレアチニン量を算出し、補正に使用した。

3. 統計学的方法

妊娠の経過における差異については、ANOVA および Fisher's PLSD 多重比較検定を用いて解析を行った。有意水準は $p < 0.1$ とした。解析ソフトには第 3 章と同じく Microsoft Excel (マイクロソフト社, ワシントン), およびアドインソフトである「Statcel」((有)OMS 出版, 埼玉)を使用した。

C. 結果

尿中ビオチン量

Figure. 7 は妊婦の尿中ビオチンの平均値の推移を示したグラフである。3 ヶ月から 8 ヶ月にかけて尿中ビオチンが下がっていた。

Figure. 8 は個体ごとの妊娠 3 ヶ月, 8 ヶ月および産後一ヶ月の尿中ビオチン量の推移を示したグラフである。妊娠 3 ヶ月~8 ヶ月にかけて, 12 人中 8 人の妊婦の尿中ビオチン量が低下していた。また, 妊娠 8 ヶ月~産後 1 ヶ月にかけて, 12 人中 10 人の尿中ビオチンが上昇した。

尿中 3-HIA 量

Figure. 9 は尿中 3-HIA を示したグラフである。3-HIA は妊娠 3 ヶ月から 6 ヶ月にかけて変化があまりなかったものの, 妊娠 6 ヶ月から 8 ヶ月にかけて有意に増加した。その後, 産後 1 ヶ月にかけて有意に減少した。特に産後 1 ヶ月の時点では 12 人中 6 人の妊婦から 3-HIA が検出されなかった。

D. 考察

尿中 3-HIA 量は妊娠 8 ヶ月をピークに増加した後, 出産後 1 ヶ月かけて低下した。一方, 尿中ビオチン量は妊娠 8 ヶ月に減少している。また, 差は見られないものの, 妊娠 8 ヶ月から産後 1 ヶ月にかけて 12 人中 10 人の尿中ビオチン量が増加している。このことから, 妊

娠8ヶ月の段階で最も体内のビオチン不足が引き起こされることが推察される。

尿中ビオチン量が妊娠8ヶ月にかけて減少すると同時に尿中3-HIAは8ヶ月にかけて上がっていることから、ヒトの妊娠においてもビオチンの栄養状態を示す指標として有用であることが示唆される。

ビオチン状態を示す指標として、尿中ビオチン量や血中ビオチン量などがあげられる。しかし、尿中ビオチン量は一日の食事内容によって大きく変動するために、長期的な栄養状態を見る上での指標として有用とはいえない。血中ビオチン量に関しても、被験者10人に人為的にビオチン欠乏にさせても、有意な減少が見られないとの報告例がある¹⁰⁾。

また、ビオチン欠乏妊娠マウスの遊離ビオチンの割合(ビオチン遊離率)がコントロール群と比べて低い、という報告²⁰⁾がある。しかし、欠乏と判断するためのcut off値を決めるのが難解である。また、ヒトの血中ビオチン量を測定時の酸加水分解処理段階で結合しているタンパクにより、測定値に影響をおよぼすという報告²¹⁾もある。よって、ビオチン遊離率も指標として有用であるとはいえない。一方、尿中3-HIAは前で示したように、欠乏症が発症する前に、尿中に検出されることから、ビオチンの欠乏指標として有用であることが示唆された。

妊娠に関して、今回の実験では、尿中ビオチンの低下と同時に尿中3-HIAの増加が見られた。また、妊娠後期になるに従い、妊婦の血中ビオチン濃度や尿中へのビオチン排泄が減少し、尿中の3-HIA排泄が有意に増加するという報告がある²²⁾。さらに妊婦によるビオチン補給実験では、ビオチン補給群がプラセボ群と比較して3-HIAが有意に減少するという報告がある⁶⁾。

またビオチン欠乏時にロイシンを与えると尿中3-HIAが増加することから、ビオチン欠乏がロイシン異化に関与するMCCの活性に影響を与えた結果3-HIAが排泄されるということがわかっている²³⁾。

しかし、妊娠時のビオチン不足だけでなく、ビオチン関連疾患によるビオチン欠乏時でも3-HIAがビオチン栄養状態の指標として有用なのであろうか。

これまでに、ビオチンダーゼ欠損症患者、および特殊ミルク依存によってビオチン欠乏した小児の尿の3-HIA量を測定した。ビオチンダーゼ部分欠損症患者の尿中3-HIA量は

61.9 μ g/mg creatinine, 特殊ミルク依存によって欠乏した小児の尿中3-HIA量は81.7 μ g/mg creatinineだった。

これらの患者にビオチンを投与し、一ヵ月後の尿中3-HIAは、ビオチンダーゼ欠損症患者は5.9 μ g/mg creatinineと減少し、特殊ミルク依存小児の尿からは検出されなくなった。以上の点から、尿中3-HIAがヒトにおいてもビオチン栄養状態を反映する指標として有用であることが示唆される。

今後の課題としてはまず、ビオチン欠乏群の尿中3-HIAの減少、またビオチン添加群の尿中ビオチン量の減少など、それぞれの体内動態に関しては未だ不明な点が多い。実験動物を用いてMCCなどのビオチン関連酵素活性を検討する必要がある。特に、ヒトにビオチンを投与するとビオチンスルホンやビスノビオチンメチルケトンといった、ビオチン異化代謝物の尿中への排泄が増加するという報告²⁷⁾もあり、これらの動態についても検討する必要がある。

また、ヒト妊婦の尿中3-HIA増加がビオチン欠乏によるものなのか、妊娠中における母体、体内での特異的な変化からなのかが不明である。よって今後、食事調査によって妊娠期間中におけるビオチン出納についての検討し、妊娠期におけるビオチンと3-HIAとの関係について詳細に解析する必要がある。

以上の問題を解決し、尿中3-HIAがビオチンの必要性を検討する為の基礎的データとなるよう、ビオチン栄養状態の指標としての有用性をさらに高めることが今後の課題として考えられる。

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(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) 渡邊敏明 (日本ビタミン学会編) : ビタミンの事典, pp.307-310, 朝倉書店, 1996.
- 2) 成沢邦明 (日本ビタミン学会編) : ビタミン学(II), p.473, 東京化学同人, 1980.
- 3) Gompertz D, Draffan G.H, Watt, J.L Watt, D.H. : Biotin-Responsive β -Methylcrotonylglyciburia. *Lancet*, 22-24, 1971.
- 4) Mock D.M, Dyken, M.E. : Biotin catabolism is accelerated in adults receiving long-term therapy with anticonvulsants. *Neurology*, 49, 1444-1447, 1997
- 5) Mock, D.M., Stadler, D.D., Stratton, S.L., Mock, N.I. : Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J.Nutr.*, 127, 710-716, 1997.
- 6) Mock, D.M, Quirk, J.G, Mock, N.I. : Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr*, 75, 295-99, 2002.
- 7) Sealey M.S, Teague, A.M, Stratton, L.S, Mock, D.M. : Smoking accelerates biotin catabolism in women. *Am J Clin Nutr*, 80, 932-935, 2004
- 8) Watanabe, T. : Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J.Nutr.*, 113, 574-581, 1983.
- 9) Zempleni, J, Mock, D.M. : Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proc Soc Exp Biol Med* 223, 14-21, 2000.
- 10) Mock N.I, Malik, M.I, Stumbo, P.J, Bishop, W.P, Mock, D.M. : Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin. *Am J Clin Nutr.*, 65, 951-958, 1997.
- 11) Mock D.M, Henrich C.L, Carnell N, Mock, N.I. : 3-hydroxypropionic acid and methylcitric acid are not reliable indicators of marginal biotin deficiency in humans. *J.Nutr.*, 134, 317-320, 2004
- 12) Mock D.M, Jackson H, Lankford G.L, Mock N.I, Weintraub S.T. : Quantification of urinary 3-hydroxyisovaleric acid using deuterated 3-hydroxyisovaleric acid as internal standard. *Biomed Environ Mass Spectrom.* Sep; 18(9):652-6, 1989
- 13) 渡邊敏明, 大口憲一, 榎原周平, 福井徹 : 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 *生物試料研究*, 27: 309-312, 2004
- 14) Watanabe T, Oguchi K, Ebara S, Fukui T. : Measurement of 3-hydroxyisovaleric acid in urine of biotin-deficient infants and mice by HPLC. *J. Nutr.*, 135, 615-618, 2005
- 15) 大口憲一 : ビオチン欠乏状態の指標としての尿中有機酸の有用性についての基礎的研究 *姫路工業大学環境人間学部学士論文*, 2004
- 16) 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 Chromato*, 416, 237-245, 1987.
- 17) Miwa H, Yamamoto M. : High-Performance Liquid Chromatographic analysis of serum short-chain fatty acids by direct derivatization. *J Chromato*, 421, 33-41, 1987.
- 18) 島津校則 *液体クロマトグラフ有機酸分析システム応用データ集*
- 19) 有機酸分析システムの応用 (その2) -UV 検出方途の比較- 島津アプリケーションニュース NO.L21
- 23) Mock, D.M Margaret, I.M. : Distribution of biotin in human plasma most of the biotin is not bound to protein. *Am J Clin Nutr.*, 56, 427-432, 1992
- 24) Mock D.M, Stadler D.D, Stratton S.L, Mock, N.I. : Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J.Nutr.*, 127, 710-716, 1997.
- 25) Mock D.M, Henrich C.L, Carnell N, Mock N.I. : Indicator of marginal biotin deficiency and repletion in humans: validation of 3-Hydroxyisovaleric acid excretion and leucine challenge. *Am J Clin Nutr*, 76, 1061-1068, 2002.
- 26) Zempleni J, McCormick D.B, Mock D.M. : Identification of biotin sulfone, bisnorbiotin methyl ketone, and tetranorbiotin-L-sulfoxide in human urine. *Am J Clin Nutr* 65:508-511, 1997

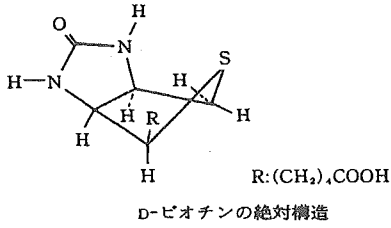


Fig. 1 ビオチンの化学構造

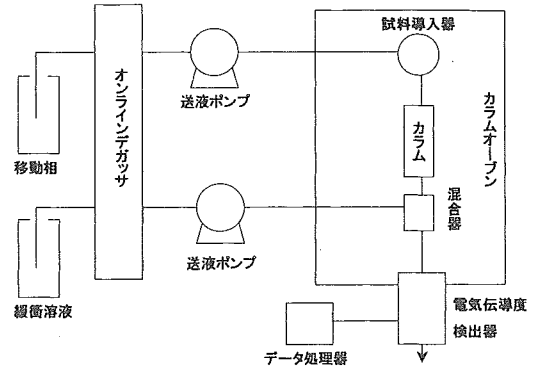


Fig. 6 有機酸分析システムのHPLC 流路図

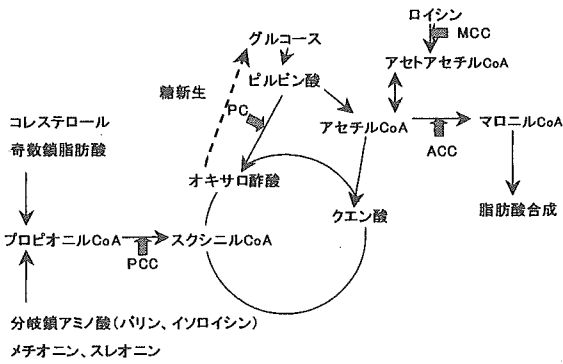


Fig. 2 ビオチンが関与する代謝経路

PC:ピルビン酸カルボキシラーゼ
PCC:プロピオニル CoA カルボキシラーゼ
ACC:アセチル CoA カルボキシラーゼ
MCC:β-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ

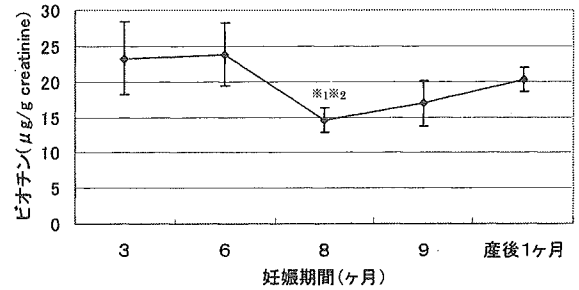


Fig. 7 尿中ビオチン量推移

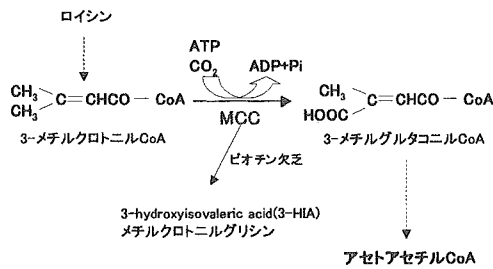


Fig. 3 MCC が関与している反応経路

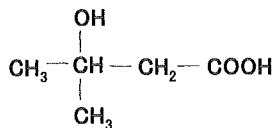


Fig. 4 3-HIA の化学式

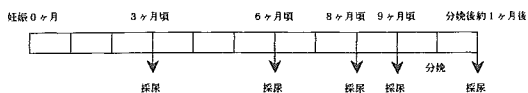


Fig. 5 採尿スケジュール

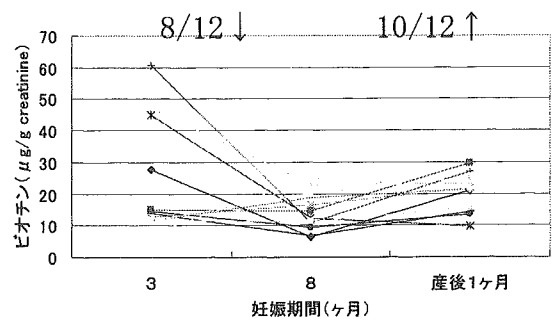


Fig. 8 妊娠3ヶ月・8ヶ月・産後1ヶ月の尿中ビオチン推移

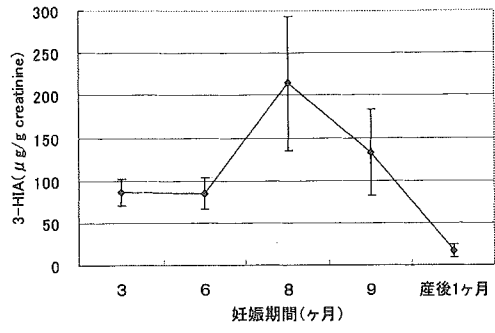


Fig. 9 尿中 3-HIA 推移

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

11. ヒトにおける葉酸摂取量と血中濃度の関連

分担協力者 渡邊敏明 兵庫県立大学 教授
研究協力者 榎原周平 兵庫県立大学 助手
研究協力者 福井徹 病体生理研究所 室長

研究要旨

平成 11 年に第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準で、水溶性ビタミンである葉酸およびビオチンなどの所要量が初めて策定された。しかし、ビタミンにおける摂取基準を策定するための根拠となる科学的データはわが国では少なく、十分な検討がされているとはいえない。我々は、東北地区に住む中高齢者を対象に健康・栄養調査を行なう機会を得た。そこで、この調査の一環として、本研究では、健常な中高齢者を対象に、食事から葉酸が摂取されているのか、血中濃度がどの程度存在しているのかを知るために調査を実施した。葉酸の摂取量は、全体の年平均値では $435 \pm 117 \mu\text{g/day}$ であり、11 月で $473 \pm 109 \mu\text{g/day}$ と高値と、8 月が $405 \pm 120 \mu\text{g/day}$ と低値を示し、季節変動が観察された。血中葉酸濃度は全体において年平均値では $6.8 \pm 2.8 \text{ng/mL}$ であり、2 月が $4.9 \pm 1.5 \text{ng/mL}$ と低値を、8 月が $8.8 \pm 3.3 \text{ng/mL}$ と高値を示し、季節変動が観察された。また、男女を比較すると、年平均で男性では $5.8 \pm 2.2 \text{ng/mL}$ で、女性では $7.8 \pm 2.8 \text{ng/mL}$ であり有意な相違がみられた。このようなことから、葉酸の推奨量の策定については男女差があることを考慮する必要性が示唆された。

A. 目的

葉酸は水溶性ビタミンである。化学構造はN-ヘテロ環のプテリジンとp-アミノ安息香酸からなるプテロイル基、つまり4- [(2-アミノ-4(3H)-オキソプテリジン-6-イル)メチル)アミノ] 安息香酸に1~7個のL-グルタミン酸が結合したプテロイル (ポリ) グルタミン酸である¹⁾ (Fig.1)。食品に含まれるのは、プテロイルポリグルタミン酸型 [PteGlu_n (n=2-11)] であり、消化管内でモノグルタミン酸型 (PteGlu) となり、吸収される。血漿や尿中では、モノグルタミン酸型、組織中ではポリグルタミン酸型としてタンパク質と結合した形で機能している。なお、小腸粘膜では、プテリジン環が還元されてテトラヒドロ型となり、さらにメチルテトラヒドロ型となり、血液中に放出される。還元型葉酸は、細胞内では補酵素として、ヌクレオチド類の生合成やメチル基の生成転換系などに関与している (Fig. 2)。また、アミノ酸やタンパク質の代謝などにも不可欠であり、グリシン、セリン、メチオニンの代謝やビタミンB₁₂とともにホモシステインからメチオニンの生成などにも関与している (Fig. 3)²⁾。

葉酸の生理機能としては、正常な造血機能を保つために重要であるばかりでなく、成長や妊娠の維持にも欠かせないビタミンである。欠乏症状としては、造血機能に異常が生じ、巨赤芽球性貧血や神経障害が知られている。最近、多くの疫学調査によって、葉酸が、胎児における神経管閉鎖障害の発症リスクの低減に効果があることが認められている。また、葉酸の摂取量が低下すると、血漿ホモシステインが上昇し、動脈硬化症と関連がある血液凝固因子や血管内皮細胞に影響を及ぼすことが見出される³⁾。

平成11年に第六次改定日本人の栄養所要量—食事摂取基準で、水溶性ビタミンである

葉酸およびビオチンなどの所要量が初めて策定された⁴⁾。葉酸の所要量は15歳以上の男女で200μg/dayと決められた。また、日本人の食事摂取基準2005年版では12歳以上の男女で推奨量が240μg/dayとされている⁵⁾。しかし、米国や英国では妊娠を予定している女性は葉酸を400μg/day摂取すべきであると医学的ガイドラインで策定されている⁶⁾。また、ビタミンにおける摂取基準を策定するための根拠となる科学的データはわが国では少なく、十分な検討がされているとはいえない。

我々は、東北地区に住む中高齢者を対象に健康・栄養調査を行なう機会を得た。そこで、この調査の一環として、本研究では、健常な中高齢者を対象に、食事から葉酸が摂取されているのか、血中濃度がどの程度存在しているのかを知るために調査を実施した。

B. 実験方法

1. 対象者

対象者は、東北地方にあるS市近郊に住む実年者 (平均61.7±8.5歳) で、男女各60名ずつの計120名である。調査の実施時期は、11月 (秋期)、2月 (冬期)、5月 (春期) および8月 (夏期) の計4回である。調査実施日の前夜から絶食して、当日の朝、空腹時に採血を行った。血液は、採血後遠心して血清を分離してサンプルとした。食事については、栄養士が24時間思い出し法で調査を行った。併せて生活習慣 (飲酒の有無、運動量) および健康状態について調査した。

なお、本研究は、東北大学医学部の倫理委員会の承認を受け、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。

2. 分析方法

血清の葉酸は、化学発光免疫測定法で分析