

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

1. ポストカラム誘導体の蛍光検出による尿中パントテン酸の定量に関する研究

—イオンペア試薬を用いた無勾配 HPLC 法の開発—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

パントテン酸の定量には微生物定量法が用いられている。本研究では、尿中のパントテン酸をより簡便かつ短時間、高精度で定量することを目的として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた蛍光検出法の開発を行った。測定法の特徴は、イオンペア試薬を用い、移動相を無勾配で流し分離させた点、ポストカラムでパントテン酸を誘導体化し、蛍光検出した点である。具体的な方法として、測定する尿は前処理なしで HPLC に注入した。HPLC システム内で、まずパントテン酸を ODS カラムとイオンペア試薬ドデシルトリメチルアンモニウムクロリドで他の尿中物質と分離した。その後、100°C アルカリ条件下でパントテン酸をβ-アラニンとパントイン酸に分解し、そのβ-アラニンをオルトアルデヒドと反応させ、1-アルキルチオ-2-アルキルイソインドールを生成させた。この 1-アルキルチオ-2-アルキルイソインドールは蛍光を持つため、これを蛍光検出器で測定した。検出限界は 5 pmol/injection であり、日内変動、日間変動、正確度 (accuracy) は全て 10%以内であった。測定時間は 1 試料あたり約 25 分であった。

A. 目的

本研究室では、これまでヒト介入試験^{1,3)}およびフリーリビングのヒトを対象にした非介入試験⁴⁾の結果から、B群ビタミンの摂取量は各ビタミンの尿中排泄量によって評価できることを明らかにしてきた。

B群ビタミンの一つであるパントテン酸(PaA)は、補酵素であるCoAやアシルキヤリアープロテインの構成成分であり、さまざまな代謝に関与している。その中でも特に脂質代謝において重要な役割を担っており、ラットに高脂肪食を与えた時、PaAの必要量が高まることも明らかになっている³⁾。

PaAの定量には *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物定量法⁵⁾が一般的な定量法として用いられてきた。微生物定量法の利点として、特殊な機器を必要としないこと、安価であること、特別な技術を必要としないことが挙げられる。しかし、化合物を同定せずに測定すること、正確度が低いことなどの問題点がある。この点において、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた定量法では、化合物を同定して測定することができ、正確度が高い。これまでに、HPLCを用いたPaA定量法が報告されているが^{6,7)}、HPLC用試料を調整するための前処理が繁雑であるため、大量の試料の測定には適していない。

本研究では、簡便かつ短時間、高精度で測定できるPaA定量法を開発することを目的として、Blancoら⁶⁾とPakinら⁷⁾の方法を改良し、改良法の検出限界、精度等について検討した。

B. 実験方法

1. 試薬と機器

パントテン酸カルシウム ($[(\text{HOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{OH})\text{CONH}_2\text{CH}_2\text{COO})_2\text{Ca}] = 476.54$), オルトフタルアルデヒド(OPA, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CHO})_2 = 134.13$), 3-メルカプトプロピオン酸(3-MPA, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S} = 106.14$), 水酸化ナトリウム($\text{NaOH} = 40.00$), リン酸二水素カリウム($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136.09$), アセトニトリル($\text{CH}_3\text{CN} = 41.05$)を和光純薬工業(株)から購入した。ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド(DTMA-Cl, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl} = 263.89$)を東京化成工業(株)から購入した。

HPLCのシステム構成はオートサンプラーに島津SIL-10AD_{VP}, ポンプ-1から-3に日立L-2130, カラムオープン-1に日立L-2350, カラムオープン-2に日立655A-52, 蛍光検出器とデータプロセッサに島津RF-10A_{XL}と島津C-R8Aをそれぞれ使用した。

2. 試料および試薬の調製

PaA標準液は超純水で1mMになるように調製し、-20℃で保存した。そして測定時に超純水で適当な濃度に希釈して使用した。

バリデーションにはクオリティーコントロール(QC)としてスポット尿を、微生物定量法との比較には24時間尿を使用した。尿は-20℃で保存し、必要なときに溶かして使用した。尿は遠心を4℃で15000 × g, 10分間行い、上清をマイクロフィルター(pore size 0.45 μm; Millipore, Bedford, USA)でろ過したものを直接HPLCに注入した。

3. 分析法

尿中のPaAを測定するためにBlancoら⁶⁾とPakinら⁷⁾の方法を改変した(図1)。第一段階でPaAの分離を行い、第二段階でPaAをパントイン酸とβ-アラニンに熱アルカリ条件下で加水分解し、最後にβ-アラニンを

3-MPA 存在下で OPA と反応させる。この生成物である 1-アルキルチオ-2-アルキルイソインドールは蛍光物質であり、励起波長が 345 nm, 蛍光波長が 455 nm で測定した。

PaA と尿中の妨害ピークの分離には無勾配逆相システムを用いた。カラムは Tosoh ODS-80Ts を使用し、カラムオープン-1 は 40℃ に設定した。移動相は 5% アセトニトリルおよび 5 mM DTMA-Cl を含む 60 mM KH_2PO_4 -NaOH バッファー (pH 7.0) とし、ポンプ-1 を用い流速 1 ml/min で流した。PaA の熱アルカリ加水分解はポンプ-2, カラムオープン-2, 60 m の PTFE チューブ (0.5 mm i.d.) を用いて行なった。ポンプ-2 は 600 mM NaOH を流速 0.5 ml/min で流し、カラムオープン-2 は 100℃ に設定した。ポンプ-3 を用いて、10 mM OPA と 16 mM 3-MPA の混合液を流速 0.5 ml/min で流し、加水分解された PaA 由来 β -アラニンと反応させ 1-アルキルチオ-2-アルキルイソインドールにした。

4. バリデーション

日内変動は QC 尿を用いて、同日に 5 回測定し計算した。日間変動は異なる 3 日に QC の測定を各 5 回測定し計算した。日内および日間変動は変動係数 (CV) を用い、 $\text{CV}(\%) = (\text{標準偏差 (SD)} / \text{平均値}) \times 100$ で求めた。正確度 (accuracy) は回収率と同じ実験で求めた。正確度は相対誤差 (RE) を用いて計算した。計算式は以下の通りである： $\text{RE}(\%) = \{(\text{回収量} - \text{添加量}) / \text{添加量}\} \times 100$ 。回収率は異なる 3 つの濃度 (100, 200, 400 pmol/injection) を添加し、その回収量で評価した。計算式は以下の通りである： $\text{回収率}(\%) = (\text{回収量} / \text{添加量}) \times 100$ 。

日内変動、日間変動および正確度は全て 10% 以内を基準とした。

5. 微生物定量法との比較

HPLC 法と微生物定量法による測定値の比較をするために、121 人 (9 歳~80 歳) 分の尿を測定した。微生物定量法は *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた⁵⁾。

C. 結果

1. 分離条件

移動相にイオンペア試薬を使用した場合と使用しなかった場合を比較した。イオンペアを使用せずに測定すると、PaA が十分に分離できていなかった (図 2A)。イオンペア試薬である DTMA-Cl を使用すると他の妨害ピークと分離することができた (図 2B)。試料 1 つ当りの測定時間は約 25 分であった。

2. バリデーション

PaA 標準溶液の検量線を 5~400 pmol/injection の範囲で引くと、 $y = 2048x + 11370$ ($r = 0.997$) となり、QC 尿の検出限界は 5 pmol であった。

QC 尿の日内変動と日間変動は共に 5% 以内となった (表 1)。正確度は表 2 に示した。QC 尿への添加量が 100, 200, 400 pmol/injection の時の正確度はそれぞれ 1.1%, -6.1%, -3.6% であり、すべて 10% 以内であった。

QC 尿への添加量が 100, 200, 400 pmol/injection の時の回収率はそれぞれ $101 \pm 3.0\%$, $94 \pm 1.0\%$, $96 \pm 2.6\%$ であった (表 3)。

3. HPLC 法とバイオアッセイ法による尿中 PaA 量の比較

本 HPLC 法と現在スタンダードであるバイオアッセイ法との差異を調べるために、両方法で 24 時間尿中 PaA 排泄量を測定し、比較した。HPLC 法で測定した値はバイオアッセイ法による値とほぼ同じであった (図 3)。

HPLCの値 (y) とバイオアッセイの値 (x) から求めた関係式は $y = 0.74x + 1.35$ ($r = 0.91$), $p < 0.001$ であった。

D. 考察

本研究は尿中 PaA の前処理を必要としない測定法の開発を目的として、イオンペア試薬を用いた無勾配逆相 HPLC 法の開発を行った。イオンペア試薬と無勾配システムを使うことによって、簡易で精度の高い、測定時間の短い測定が可能になった。現在のスタンダードであるバイオアッセイ法とも値が変わらないため、煩雑で時間のかかるバイオアッセイ法の代わりに使用できると考えられる。

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. Fukuwatari T, Shibata K. Urinary water-soluble vitamins and their metabolite

contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* (2008) 54, 223-229.

2. 柴田克己. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金, 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業. 日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究, 平成 15 年度総括・分担研究報告書. 2004.
3. 柴田克己. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金, 循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業. 日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) の策定に関する研究, 平成 18 年度総括・分担研究報告書. 2007.
4. 柴田克己. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金, 循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業. 日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—, 平成 19 年度総括・分担研究報告書. 2008.
5. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-26.
6. Blanco M, Coello J, MasPOCH S, Pagès J. Fluorimetric determination of calcium pantothenate. Validation and quantitation in multivitamin preparations. *Anal Lett* (1995) 28, 821-833.
7. Pakin C, Bergaentzlé M, Hubscher V, Aoudé WD, Hasselmann C. Fluorimetric determination of pantothenic acid in foods by liquid chromatography with post-column derivatization. *J Chromatogr A* (2004) 1035,

表 1. 尿中 PaA 排泄量測定の日内, 日間変動

	日内変動 (n = 5)		日間変動 (n = 3)	
	測定値 (nmol/ml)	CV* (%)	測定値 (nmol/ml)	CV* (%)
尿	7.67 ± 0.05	0.63	7.60 ± 0.06	0.79

*CV: 変動係数. $CV(\%) = (SD / \text{平均値}) \times 100$

測定にはスポット尿を用いた. 測定値は平均値 ± SD で示した.

表 2. PaA の回収率

添加量 (pmol/injection)	回収量 (pmol/injection)	正確度 (RE, %)*	回収率** (%)
100	101	1.1	101 ± 3.0
200	188	-6.1	94 ± 1.0
400	386	-3.6	96 ± 2.6

* RE: 相対誤差. $RE(\%) = \{(\text{回収量} - \text{添加量}) / \text{添加量} \} \times 100$.

** 回収率 (%) = (回収量 / 添加量) × 100. 値は平均値 ± SD (n = 3) で表した.

試料はスポット尿に各濃度の PaA を添加して測定した.

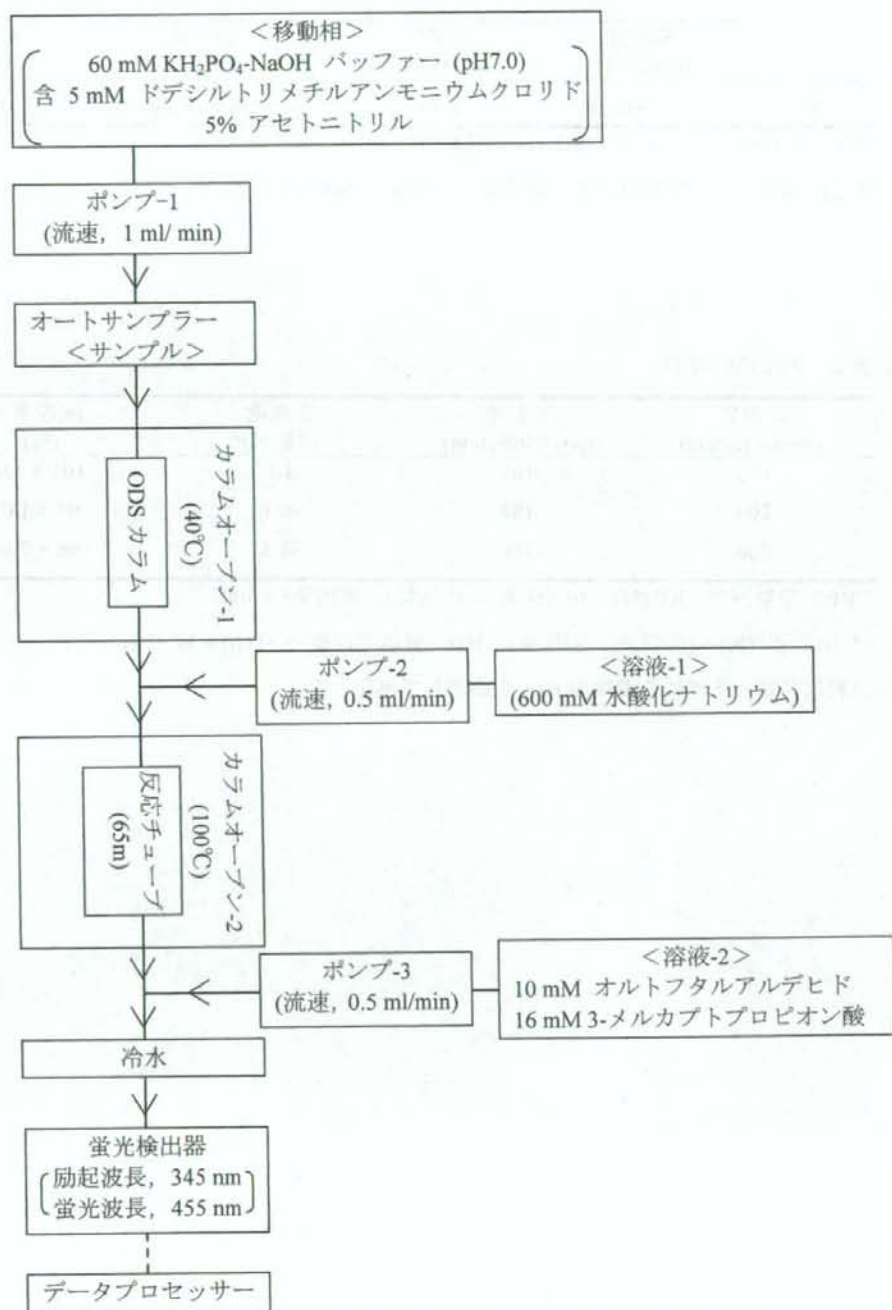


図 1. HPLC システム構成図および条件

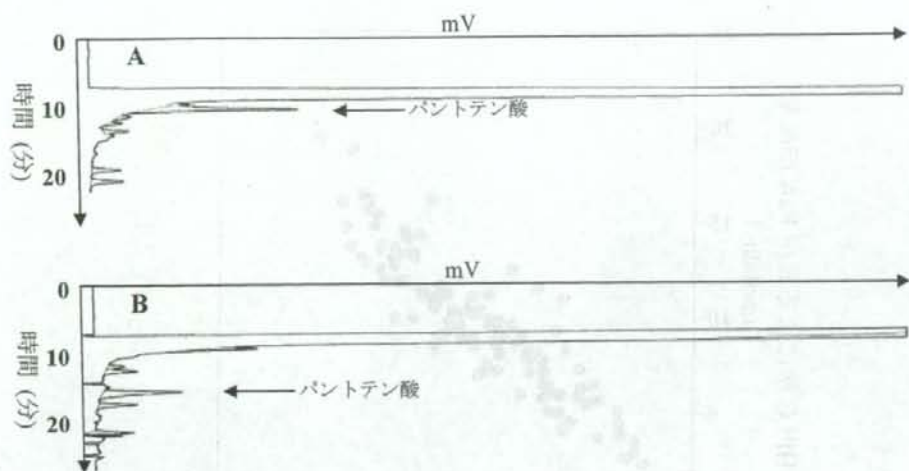


図2. 尿測定におけるイオンペア試薬によるクロマトグラフの変化

(A) イオンペア試薬なし, (B) イオンペア試薬 (ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド, DTMA-Cl) あり.

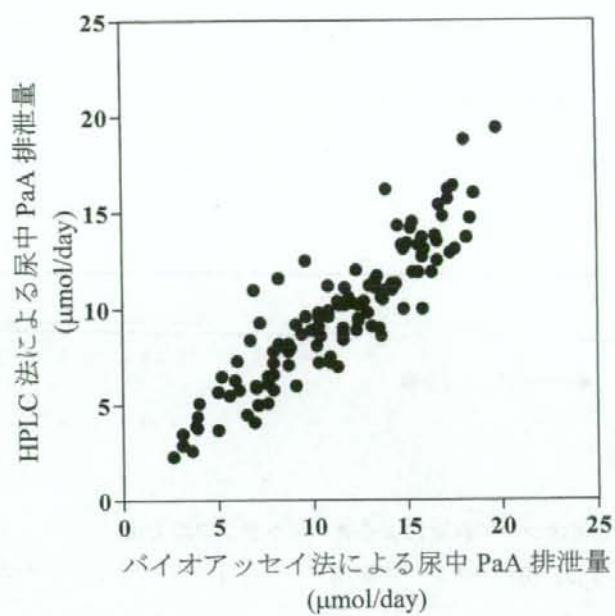


図 3. HPLC 法とバイオアッセイ法による尿中 PaA 排泄量の比較
 微生物定量法は *Lactobacillus plantrum* ATCC 8014 を用いた方法⁵⁾で測定した。

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

2. 妊娠、授乳期間中における水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量の追跡調査

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

我々は児童、大学生、高齢者を対象に水溶性ビタミンの摂取量と尿中への排泄量との関連性を検討し、いずれの年齢階層においても尿中排泄量は摂取量を反映することを明らかにしてきた。しかし、妊娠または授乳期間中のヒトを対象とした研究は行っていない。そこで本研究では、妊婦、授乳婦における水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量の関係を明らかにすることを目的とした。被験者は妊娠および授乳期間中、月に一度の頻度で 24 時間尿の採尿と自記式食事歴法質問票 (DHQ) の記入を継続して実施し、水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量の推移を追跡調査する。また、摂取量と尿中排泄量の関係から尿中排泄率 (= 排泄量 / 摂取量 × 100) を算出し、その値を非妊娠、非授乳女性 (女子学生) と比較することで、妊娠や授乳が水溶性ビタミンの代謝におよぼす影響を検討した。

現在 5 ヶ月目の調査に入った段階である。現在までの調査の結果、妊婦の尿中ナイアシン排泄率は女子学生と比較して高値を示し、授乳婦のパントテン酸およびビタミン C の排泄率は低値を示した。

なお、本研究は本年度に引き続き 3 ヶ年計画で実施する予定である。

A. 目的

近年、栄養素摂取量を反映するバイオマーカーとして尿の利用が注目を集めている。これまでに、尿中窒素排泄量を利用したたんぱく質摂取量の評価¹⁾、尿中スクロースおよびフルクトース排泄量を利用した糖類摂取量の評価²⁾、尿中カリウム排泄量を利用したカリウム摂取量の評価³⁾が確立されている。水溶性ビタミンについても、平成15年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究」および平成18年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準(栄養所要量)の策定に関する研究」で行われたヒト介入試験^{4,5)}によって、ビタミンB₁₂を除く8種類の水溶性ビタミンについて、尿中排泄量は摂取量を鋭敏に反映することが明らかとされた。さらには、平成19年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究」⁶⁾で行われた自由に日常生活を営んでいるヒトを対象とした調査でも、ビタミンB₁₂、ビオチンを除く7種類の水溶性ビタミンについて、摂取量と尿中排泄量との間に相関が認められた。

妊娠や授乳期間中は代謝が亢進し、必要量が增大しているとの考えから、日本人の食事摂取基準(2005年版)⁷⁾ではエネルギー、たんぱく質、脂質、ビタミンKを除く12種類のビタミン、マグネシウム、鉄、銅、亜鉛、セレン、ヨウ素、カリウムについて付加量が設定されている。しかしながら、ビタミンに関して、妊婦や授乳婦で必要量が增大していることを示した科学的根拠は乏しい。したがって、本研究では、妊婦および授乳婦の尿中水溶性ビタミン摂

取量と尿中排泄量との関係を検討し、妊娠や授乳がビタミンの代謝におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

B. 調査方法

1. 対象者

S県内の妊婦5名、授乳婦20名(妊娠期から乳児が1歳の誕生日を迎えるまで)を対象にして、月1回の頻度で継続的な研究調査を開始した。また、S県内の大学に在籍する女子(女子学生)105名を対象にして、食事調査と採尿を実施した。このうち、尿のとり忘れまたはとりこぼしがないこと、蓄尿時間が22時間以上26時間以内であること、尿量が250 mL以上であること、自記式食事歴法質問票(DHQ)から算出したエネルギー摂取量が500 kcal以上4000 kcal以下であること、最近1ヶ月間はビタミン剤を服用していないことの全てを満たす妊婦4名、授乳婦16名を解析の対象とした。女子学生については、上記の条件に加え、クレアチニン(mg/d)/体重(kg)比が10.8~25.2の範囲外の者も除外し、74名を解析の対象とした。

なお、本研究は滋賀県立大学倫理審査委員会において承認を得ており、被験者には調査の目的、検査内容、個人情報の保護などについて十分な説明を行い、インフォームド・コンセントを得ている。

2. 自記式食事歴法質問票(DHQ)

対象者には月1回の採尿日にDHQに回答してもらった。これを五訂日本食品標準成分表⁸⁾に基づいて解析し、ビオチンを除く8種類の水溶性ビタミン摂取量を計算した。ビオチンを除いた理由は、五訂日本食品標準成分表に成分値が記載されていないためである。また、ナイアシンについては、トリプトファンからニコチン

アミドが生合成されるため、ナイアシン当量摂取量と尿中排泄量との関係について調べた。

3. 24時間尿の蓄尿

被験者には、採尿日に日常と同様の飲食行動および生活行動を行うよう依頼した。起床後の2回目の尿から翌朝起床後の1回目の尿までを採尿し、24時間尿とした。被験者は、採尿開始時刻、終了時刻、尿の取りこぼし、および取り忘れの有無を記録した。24時間尿の容量を測定し、測定するビタミン毎に安定化処理をし、使用するまで-20°Cで保存した。

4. 尿中水溶性ビタミン排泄量の分析

ビタミンB₁

チアミン塩酸塩量として示した。尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した⁹⁾。

ビタミンB₂

リボフラビン量として示した。尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した¹⁰⁾。

ビタミンB₆

4-ピリドキシン酸 (4-PIC) 量として示した。尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した¹¹⁾。

ビタミンB₁₂

シアノコバラミン量として示した。尿 900 μ L に 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 180 μ L, 超純水 680 μ L, 0.0025% シアン化カリウム溶液 20 μ L, 10% メタリン酸 20 μ L を加え、120°C で 5 分間オートクレーブ処理した。氷冷後、遠心分離によって得た上清を測定用

試料とした。*Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法にて測定した¹²⁾。

ナイアシン

ニコチンアミド, N¹-メチルニコチンアミド (MNA), N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計量として示した。尿 4.5 mL に 1 M HCl を 0.5 mL 加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って尿中ニコチンアミド, 2-Py, 4-Py, 尿中 MNA 含量を測定した^{13,14)}。

パントテン酸

尿をそのまま測定用試料とした。*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法にて測定した¹⁵⁾。

葉酸

プテロイルモノグルタミン酸量として示した。尿 4.5 mL に 1 M アスコルビン酸溶液を 0.5 mL 加えて安定化した。*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物学的定量法を用いて測定した¹⁶⁾。

ビオチン

尿をそのまま測定用試料とした。*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法を用いて測定した^{17,18)}。

ビタミンC

アスコルビン酸, デヒドロアスコルビン酸, 2,3-ジケトグルコン酸の合計量とした。尿 2 mL に 10% メタリン酸溶液 2 mL を加えて安定化した。この尿を測定用試料として、HPLC 法に従って測定した¹⁹⁾。

5. 統計処理

DHQ より算出した水溶性ビタミン摂取量とその尿中排泄量, 尿中排泄率の解析には GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) を用いた。非妊娠,

非授乳女性（女子学生）の値と比較して One-way ANOVA (Dunnett 法) による検定を行った。

C. 結果

1. 被験者の特徴

表 1 に、対象者の年齢、身長、体重、BMI、栄養素等摂取量を示した。

女子学生の身体状況を「日本人の食事摂取基準（2005 年版）⁷⁾」の基準体位と比較すると、身長は 158.2 ± 5.0 cm (基準身長 156.8 cm) で 1.4 cm 増、体重は 50.7 ± 5.2 kg (基準体重 52.7 kg) で 2.0 kg 減、BMI は 20.2 ± 1.7 (基準 BMI 21.4) で 1.2 減であった。

調査対象者のうち授乳婦の身体状況を女子学生と比較すると、授乳婦の身長は 159.1 ± 4.5 cm で 0.9 cm 増、体重は 51.7 ± 4.9 kg で 1.0 kg 減、BMI は 20.4 ± 1.8 で 0.2 増であった。

栄養素等摂取量では、総エネルギー量は女子学生 1716 ± 317 kcal、妊婦 1647 ± 272 kcal、授乳婦 2272 ± 518 kcal であった。食事摂取基準推定エネルギー必要量身体活動レベル I (30~49 歳 女性 1700 kcal) に付加量 (妊婦初期 +50 kcal, 中期 +250 kcal, 末期 +500 kcal, 授乳婦 +450 kcal) を考慮して比較すると、妊婦では初期、中期、末期のいずれにおいても食事摂取基準よりも低値で、授乳婦では高値だった。なお、授乳婦は食事摂取基準推定エネルギー必要量身体活動レベル II (30~49 歳 女性 2000 kcal) に付加量を考慮したものと比較すると低値であった。たんぱく質エネルギー比、総脂質エネルギー比、炭水化物エネルギー比はいずれも食事摂取基準で定められた目標量の範囲内であった。

2. 水溶性ビタミン摂取量と尿中水溶性ビタミン排泄量との関係

女子学生、妊婦、授乳婦における水溶性ビタミン摂取量を図 1 に示した。ビタミン C を除く 7 種類の水溶性ビタミンにおいて、授乳婦の摂取量が女子学生よりも高い値を示した。妊婦ではいずれも女子学生と比較して差はみられなかった。

女子学生、妊婦、授乳婦の尿中水溶性ビタミン排泄量を図 2 に示した。ビタミン B₆ 排泄量は妊婦、授乳婦ともに女子学生よりも高値を示し、パントテン酸排泄量は低値を示した。妊婦のナイアシン排泄量は女子学生と比較して高値であり、授乳婦のビタミン C 排泄量は低値を示した。その他のビタミンでは差は認められなかった。

水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量の相関については、サンプル数が少ないため、検討を見送った。

妊婦、授乳婦において尿中水溶性ビタミン排泄量が高値を示したことが、単なる摂取量の増加によるものかどうかを調べるために、尿中排泄率 (= 排泄量 / 摂取量 × 100) を算出した (図 3)。ナイアシンは女子学生に比べ妊婦で高く、パントテン酸とビタミン C では授乳婦で低かった。

D. 考察

我々はヒト介入試験において、日本人の食事摂取基準 (2005 年版)⁷⁾に記載された推奨量の 0~6 倍量の水溶性ビタミンを付加すると、ビタミン B₁₂ を除く 8 種の水溶性ビタミンについて、尿中水溶性ビタミン排泄量は摂取量依存的に増加し、排泄量と摂取量との間に非常に強い相関があることを明らかにしてきた⁵⁾。ヒト介入試験は 1 ヶ月にわたって生活様式、食事内容

を厳密に管理して行った実験であるため、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金「日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究」⁶⁾において、自由に生活する児童、大学生を対象として水溶性ビタミンの摂取量と尿中排泄量との関係を調べた。その結果、自由に生活しているヒトであっても、ビタミン B₁₂、ビオチンを除く 7 種類の水溶性ビタミンについて、摂取量と尿中排泄量との間には相関が認められた。本研究では自由に生活している妊婦、授乳婦を対象として水溶性ビタミンの摂取量と尿中排泄量との関係を調べた。

本研究では、妊婦および授乳婦の DHQ より算出した水溶性ビタミン摂取量とその尿中排泄量から尿中水溶性ビタミン排泄率を算出し、これらの値を非妊娠、非授乳女性(女子学生)と比較した。ビタミン C を除く 7 種類の水溶性ビタミンについて、授乳婦の摂取量は女子学生よりも多かった。尿中水溶性ビタミン排泄量は、ビタミン B₆ では妊婦、授乳婦ともに女子学生よりも高値を示し、パントテン酸では反対に低値を示した。ナイアシン排泄量は妊婦で高値を示し、ビタミン C 排泄量は授乳婦で低値を示した。その結果、ナイアシンの尿中排泄率は妊婦において女子学生よりも有意に高く、パントテン酸とビタミン C の尿中排泄率は授乳婦で有意に低かった。尿中ビタミン排泄率は体内でのビタミンの代謝を反映しているため、排泄率から栄養状態を評価することができる。同じ摂取量である場合、排泄量が基準値よりも高いことは排泄率の増大を表し、体内での必要量が低下していることを示す。一方、摂取量が同じで排泄量が基準値よりも低い場合には排泄率が低下して

おり、体内での必要量は高まっていると言える。ナイアシンにおいて、妊婦では女子学生と比較して摂取量に差がないにもかかわらず尿中排泄量が増加していたことは、尿中排泄率の増大を示している。妊婦ではトリプトファン・ナイアシン転換率が 2~3 倍に上昇する²⁰⁾。そのため、妊婦は女子学生と比較してナイアシンの尿中排泄率が高まり、尿中排泄量も高値を示したと考えられる。また、ビタミン C とパントテン酸において、授乳婦のビタミン C 摂取量は女子学生と比較して差はなく、パントテン酸では多かったにもかかわらず、尿中排泄量はともに低値を示した。摂取量が同じ、もしくは高いにもかかわらず排泄量が低下している、つまり排泄率が低下していることは、これらのビタミンの体内での必要量が高まっていることを間接的に示している。パントテン酸はエネルギー代謝にかかわるビタミンであるため⁷⁾、エネルギー摂取量が多い授乳婦では、パントテン酸の必要量は高まっていると考えられる。しかしながら、パントテン酸は母乳中に多く分泌される。その値は、一日の哺乳量を 780 mL と仮定すると、 $24.9 \pm 8.9 \mu\text{mol/day}$ である²¹⁾。そのため、尿中パントテン酸排泄量の低下は、母乳中パントテン酸濃度を考慮する必要がある。同様に、ビタミン C の母乳からの喪失は、 $203.0 \pm 48.7 \mu\text{mol/day}$ であり²¹⁾、授乳婦のビタミン C 必要量は高まっていると言える。よって、これらのビタミンは女子学生と比較して授乳婦で必要量が増大したために尿中排泄率が低下し、尿中排泄量も低値を示したと考えられる。

本研究において、女子学生の水溶性ビタミン排泄率と比較して変動がみられたビタミンは、妊婦ではナイアシン、授乳婦ではパントテン酸とビタミン C の 3 種類のみであった。今後の展開として、現対象者の追跡調査を実施すると

ともにさらなる対象者を募っていく方針である。各対象者における継続したデータを蓄積することで、より精度の高い解析が可能となり、妊娠、授乳期間中における水溶性ビタミン必要量の推移のモデルを構築できると期待する。

E. 健康危険情報

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. Bingham SA. Urine nitrogen as a biomarker for the validation of dietary protein intake. *J Nutr* (2003) 133, 921S-4S.
2. Tasevska N, Runswick SA, McTaggart A, Bingham SA. Urinary sucrose and fructose as biomarkers for sugar consumption. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2005) 14, 1287-94.
3. Tasevska N, Runswick SA, Bingham SA. Urinary potassium is as reliable as urinary nitrogen for use as a recovery biomarker in dietary studies of free living individuals. *J Nutr* (2006) 136, 1334-40.
4. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimura M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N. Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J Nutr Sci Vitaminol* (2005) 51, 319-28.
5. Fukuwatari T, and Shibata K. Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* (2008) 54, 223-9.
6. 柴田克己. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金, 循環器等生活習慣病対策総合研究事業, 日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンス構築に関する研究, 平成 19 年度総括・分担研究報告書. (2008).
7. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準 (2005 年版), 日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書. (2004).
8. 科学技術庁資源調査会編. 日本食品成分表の改定に関する調査報告—五訂日本食品標準成分表—大蔵印刷局, 東京 (2000).
9. 福渡努, 鈴浦千絵, 佐々木隆造, 柴田克己. 代謝攪乱物質ビスフェノール A のトリプトファン—ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位. *食品衛生学雑誌* (2004) 45, 231-8.
10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. New metabolites of rivoflavin appear in human

- urine. *J Biol. Chem* (1983) 258, 5623-8.
11. Gregory JF, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) 32, 879-83.
 12. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* (1998) 46, 5177-80.
 13. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
 14. Shibata K. Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.
 15. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.
 16. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44, 361-70.
 17. Wright LD, Skeggs HR. Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med* (1944) 56, 95-8.
 18. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* (1994) 40, 491-8.
 19. Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S. Specific Determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high performance liquid chromatography. *Anal Chem* (1992) 64, 1505-7.
 20. Fukuwatari T, Murakami M, Ohta M, Kimura N, Jin-No Y, Sasaki R, Shibata K. Changes in the urinary excretion of the metabolites of the Tryptophan-Niacin pathway during pregnancy in Japanese women and rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (2004) 50, 392-8.
 21. 柴田克己, 遠藤美佳, 山内麻衣子, 廣瀬潤子, 福渡努. 日本人の母乳中(1~5か月)の水溶性ビタミン含量の分布(資料) *日本栄養・食糧学会誌* (2009) 62, in press.

表1. 対象者の身体的特徴

	女子学生 (n=74)	妊婦 (n=4)	授乳婦 (n=16)
年齢 (歳)	20.1 ± 2.3	31.0 ± 3.2	32.1 ± 2.2
身長 (cm)	158.2 ± 5.0	160.3 ± 6.1	159.1 ± 4.5
体重 (kg)	50.7 ± 5.2	54.8 ± 3.3	51.7 ± 4.9
BMI (体重 kg/身長 m ²)	20.2 ± 1.7	21.3 ± 0.5	20.4 ± 1.8
栄養素等摂取量			
総エネルギー (kcal/d)	1716 ± 317	1647 ± 272	2272 ± 518
たんぱく質エネルギー比 (%)	13.6 ± 1.8	12.3 ± 2.2	12.3 ± 1.1
脂質エネルギー比 (%)	30.5 ± 4.9	26.2 ± 5.4	28.5 ± 3.7
炭水化物エネルギー比 (%)	55.9 ± 5.4	61.3 ± 7.6	58.3 ± 4.3

値は平均値 ± 標準偏差で示した。

栄養素等摂取量は、DHQより算出した最近1ヶ月間の平均的な栄養素等摂取量を示す。



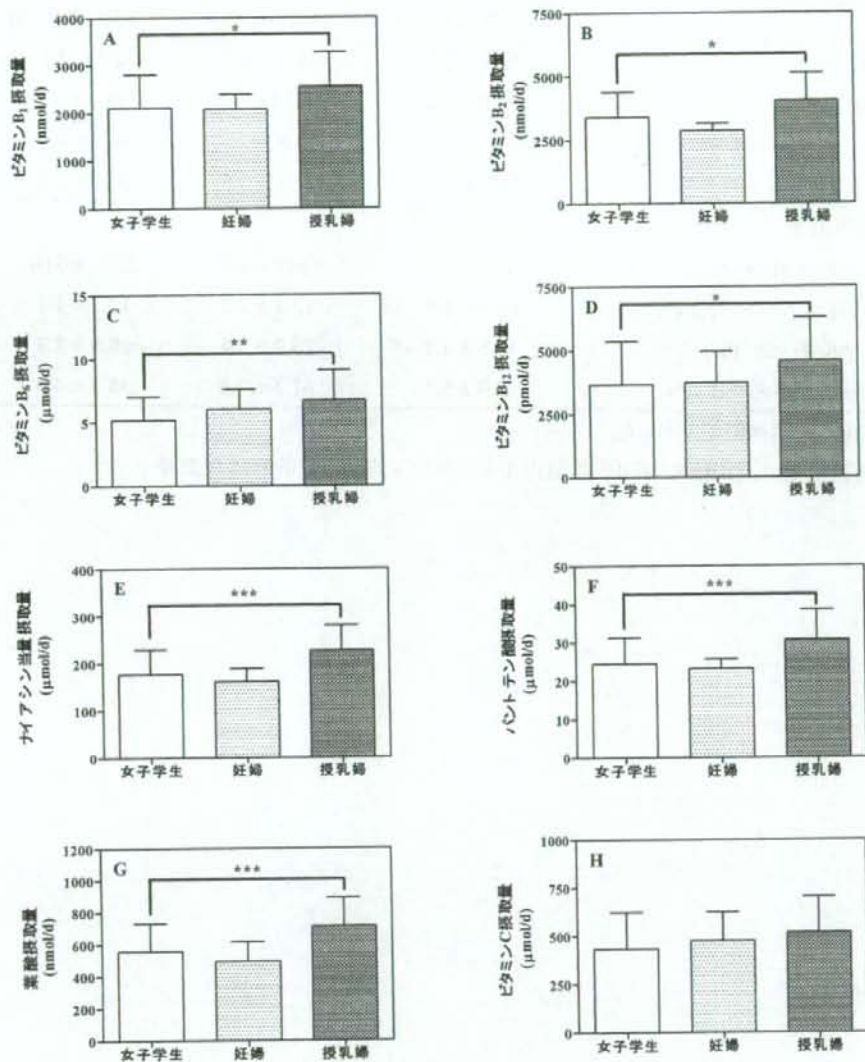


図1. 女子学生, 妊婦, 授乳婦におけるビタミンB₁(A), ビタミンB₂(B), ビタミンB₆(C), ビタミンB₁₂(D), ナイアシン当量(E), パントテン酸(F), 葉酸(G), ビタミンC(H)摂取量値は平均値 ± 標準偏差として示した. *は妊婦, 授乳婦と女子学生間に有意差があることを示す. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

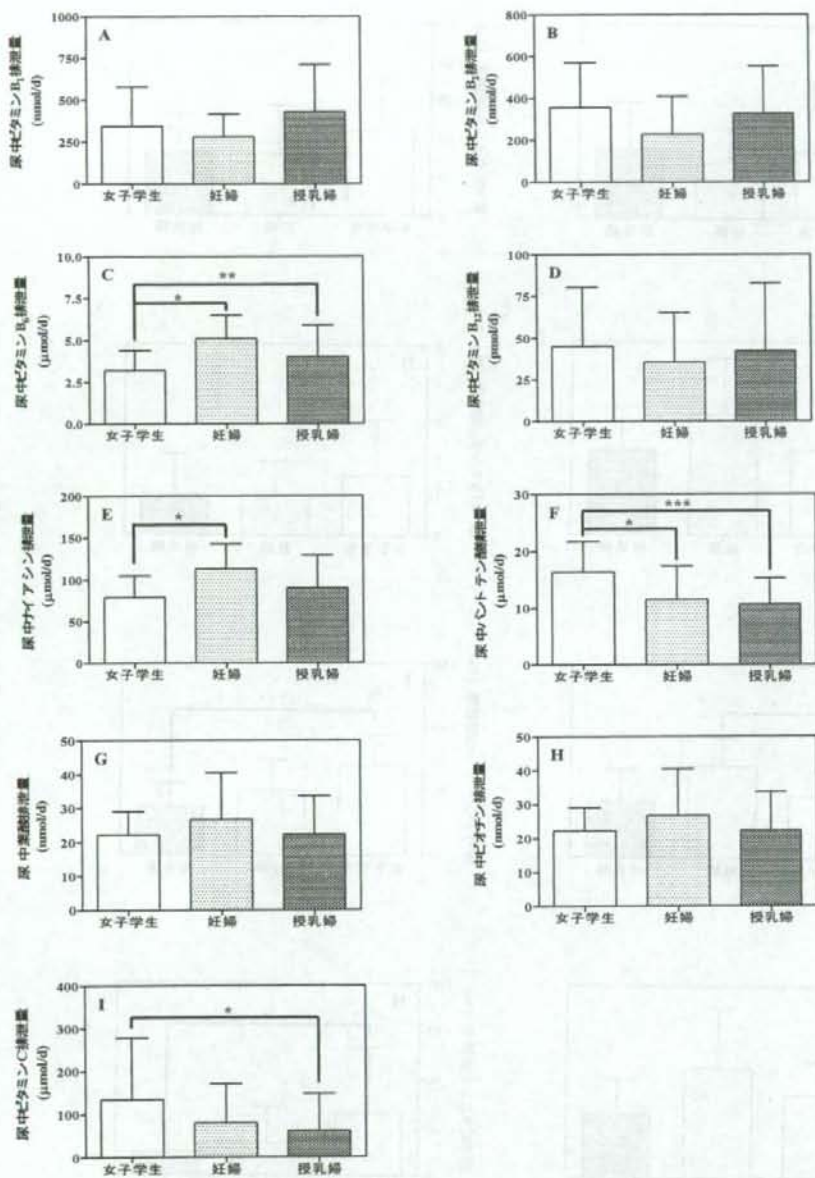


図2. 女子学生, 妊婦, 授乳婦における尿中ビタミン B₁(A), ビタミン B₂(B), ビタミン B₆(C), ビタミン B₁₂(D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H), ビタミン C (I) 排泄量

値は平均値 ± 標準偏差として示した。*は妊婦, 授乳婦と女子学生の間有意差があることを示す。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

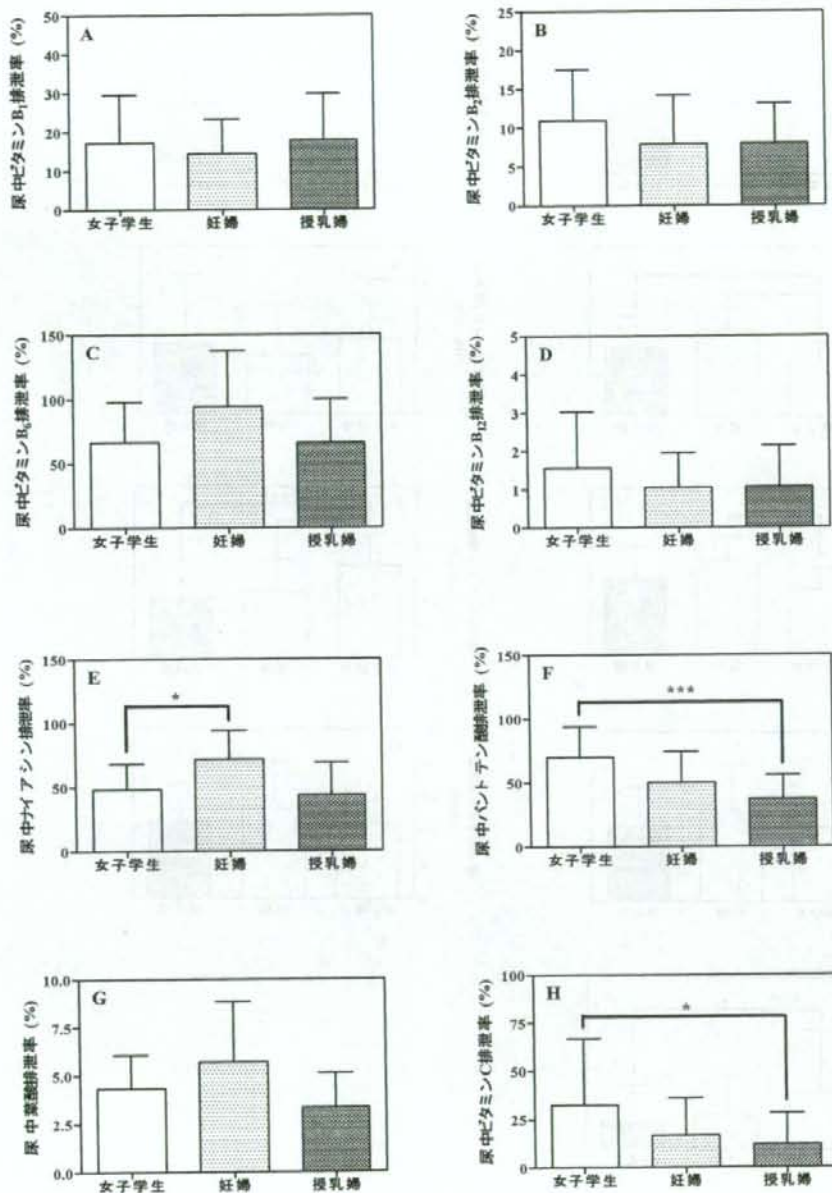


図3. 女子学生, 妊婦, 授乳婦における尿中ビタミン B₁(A), ビタミン B₂(B), ビタミン B₆(C), ビタミン B₁₂(D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビタミン C(H) 排泄率は平均値 ± 標準偏差として示した. *は妊婦, 授乳婦と女子学生との間に有意差があることを示す. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

3. 高齢者における水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量との相関

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究協力者 辻 とみ子 名古屋文理大学 准教授

研究要旨

我々は、尿中水溶性ビタミン排泄量を指標として水溶性ビタミン栄養状態を評価することを目指して、これまでに自由な生活を営む若年成人において水溶性ビタミン摂取量とその尿中排泄量が正の相関を示すことを明らかにしてきた。本研究では、自由な生活を営む高齢者における水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量との関係について検討した。本研究はまだ継続中であるが、解析に必要な被験者数を得たため、暫定的な結果を報告する。70～84 歳の高齢者 39 名を対象とし、食事記録法によって連続 4 日間の栄養素摂取量を算出し、4 日間の水溶性ビタミン平均摂取量を求めた。食事記録 4 日目に 24 時間尿を採取し、24 時間尿中水溶性ビタミン排泄量を測定した。ビオチンを除く 8 種の水溶性ビタミンについて、平均摂取量と 24 時間尿中排泄量との相関を調べたところ、ビタミン B₆ およびビタミン B₁₂ を除く 6 種の水溶性ビタミンに正の相関が認められた。以上の結果は、高齢者においても尿中水溶性ビタミン排泄量が多い者は水溶性ビタミン摂取量も多く、排泄量の少ない者は摂取量も少ないことを示している。したがって、尿中水溶性ビタミン排泄量を有効なバイオマーカーとして利用し、食事記録による摂取量と併用することにより、水溶性ビタミン栄養状態を評価できる可能性を示すものである。