

## 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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>、尿中カリウム排泄量を利用したカリウム摂取量の評価<sup>3)</sup>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<sup>4,5)</sup>によって、ビタミン B<sub>12</sub> 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にされた。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」<sup>6)</sup>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 B<sub>12</sub>、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、必要量が増加しているとの考えから、日本人の食事摂取基準（2010 年版）<sup>7)</sup>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増加しているという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 20 名、授乳婦 41 名（妊娠期から乳児が満 1 歳の誕生日を迎える月まで）を対象として、毎月 1 回の頻度で継続的な研究調査を実施した。また、非妊娠・非授乳女性として S 県内の大学に在籍する女子（女子学生）105 名について食事調査と採尿を実施した。

このうち、尿の取り忘れ、または取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もの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/day）/ 体重（kg）比が 10.8~25.2 の範囲外のものも除外し、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、対象者には調査の目的、検査内容、個人情報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）

対象者には毎月 1 回の調査日に DHQ に回答してもらった。これを五訂日本食品標準成分表<sup>8)</sup>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算出した。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して算出した。

### 3. 24時間尿の蓄尿

対象者には、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。対象者は、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、測定するビタミンごとに安定化処理をし、使用するまで-20℃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B<sub>1</sub>

チアミン塩酸塩量として示した。尿4.5 mLに1M 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<sup>9)</sup>。

#### ビタミンB<sub>2</sub>

リボフラビン量として示した。尿4.5 mLに1M 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<sup>10)</sup>。

#### ビタミンB<sub>6</sub>

4-ピリドキシン酸(4-PIC)量として示した。尿4.5 mLに1M 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<sup>11)</sup>。

#### ビタミンB<sub>12</sub>

シアノコバラミン量として示した。尿900μLに100 mM酢酸緩衝液(pH4.8)180 μL, 超純水680 μL, 0.0025%シアン化カリウム溶液20 μL, 10%メタリン酸20 μLを加え、120℃で5分間オートクレーブ処理を行った。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<sup>12)</sup>。

#### ナイアシン

ニコチンアミド, N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド

(MNA), N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py), N<sup>1</sup>-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1M 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<sup>13)</sup>, およびMNA含量<sup>14)</sup>を測定した。

#### パントテン酸

尿4.5 mLに1M HClを0.5 mL加えて安定化した後、HPLC法にて測定した<sup>15)</sup>。

#### 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1M 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<sup>16)</sup>。

#### 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<sup>17)</sup>。

### 5. 尿中排泄率の算出

これまでの研究でビタミンB<sub>12</sub>を除く8種類の水溶性ビタミンは摂取量に比例して尿中排泄量も変動することが明らかになっている<sup>4,5)</sup>。そこで、女子学生と妊婦(初期, 中期, 末期), 授乳婦(前期, 後期)のビタミン摂取量の違いを補正するために、尿中排泄率(尿中排泄量 / 摂取量 × 100)を算出した。

### 6. 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。女子学生の値と比較してOne-way ANOVA(Dunnnett

法)による検定を行った。また、摂取量と平均推定必要量 (EAR), 尿中排泄量と基準値の関係は、*t*検定による検定を行った。

## C. 結果

### 1. 対象者の特徴

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 (20.1 ± 2.3 歳) と比べて、妊婦の年齢は 10.2 歳、授乳婦の年齢は 11.3 歳高かった。胎児の成長にともない妊婦の体重は増加した。身長は妊婦、授乳婦ともに女子学生との間に差は認められなかった。

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 1831 ± 467 kcal、授乳婦 1978 ± 435 kcal であった。食事摂取基準推定エネルギー必要量 (30~49 歳 女性 身体活動レベル I 1700 kcal) に付加量 (妊婦初期 +50kcal、中期 +250 kcal、末期 +450 kcal、授乳婦 +350 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、授乳婦でも低値を示した。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示された範囲内であった。

### 2. 水溶性ビタミン排泄率の比較

女子学生、妊婦 (初期、中期、末期)、授乳婦 (前期、後期) における尿中ビタミン排泄率を図 1 に示した。妊娠末期のビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、パントテン酸排泄率は女子学生に比べて低く、ビタミン B<sub>6</sub>、ナイアシンは妊婦で高値を示した。授乳婦のビタミン B<sub>2</sub>、パントテン酸、葉酸、ビタミン C は女子学生よりも低値を、ナイアシンは高値を示した。

## D. 考察

本研究では、女子学生 74 名、妊婦延べ 20 名、授乳婦延べ 41 名を対象として、DHQ による食事調査と 24 時間蓄尿を行い、水溶性ビタミン摂取量と尿中排泄量の間関係を調査し、尿中ビタミン排泄率を算出した。排泄率で比較することにより、摂取量の差を考慮することができる。また、排泄率は体内でのビタミン代謝を反映しているため、各ビタミンの栄養状態を評価することができる。つまり、排泄率の上昇は体内での必要量の低下を示し、排泄率の低下は体内での必要量の増加を示す。この排泄率を非妊婦・非授乳婦である女子学生と比較した。

「日本人の食事摂取基準 (2010 年版)<sup>7)</sup>」の基準体位 (19~29 歳) は身長 158 cm、体重 53 kg、BMI 21.2 であり、本調査の対象者の体位とほぼ一致した。栄養素等摂取量においては、エネルギー摂取量は推定エネルギー必要量 (EER) より低値であったものの、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摂取基準に定められた範囲内であった。このことより、本調査の対象者は標準的な食生活を送っており、特に偏りのある集団ではないと考えられる。

摂取量と排泄量から排泄率を求め、女子学生、妊婦 (初期、中期、末期)、授乳婦 (前期、後期) において比較した。妊婦末期においてビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub> の排泄率が低下した。ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub> はエネルギー要求量に応じて必要量が増大する。妊娠期の体重増加により、基礎代謝量が増大する妊婦末期では、エネルギー必要量が増加する。それに伴い、妊娠末期では体内でのビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub> の必要量が増加している可能性が示された。ナイアシンにおいて妊婦は

女子学生に比べ、排泄率が3倍に上昇する。妊婦ではトリプトファン-ナイアシン転換率が2~3倍に上昇することが明らかになっている<sup>18)</sup>。そのため、体内での必要量が十分に満たされ、尿中への排泄量が増加したと考えられる。また、ビタミンCとパントテン酸においては、授乳婦で女子学生に比べて低い排泄率を示した。日本人の食事摂取基準(2010年版)<sup>7)</sup>では、母乳中のビタミンC含量の値として50 mg/Lを採用している。哺乳量を780 mLと仮定すると、1日当たりの母乳中ビタミンC含量は39 mg/dayとなる。これは授乳婦のビタミンC摂取量(98 mg/day)の40%に相当し、ビタミンCは母乳への分泌が顕著なビタミンであると考えられる。また、パントテン酸においては、母乳中含量は5.0 mg/Lとなり、1日当たりの母乳中パントテン酸含量は3.9 mg/dayとなる。これは授乳婦のパントテン酸摂取量(6.2 mg/day)の63%に相当し、パントテン酸も母乳への分泌が顕著なビタミンであると考えられる。これより、授乳婦においてビタミンC、パントテン酸の排泄率低下が認められたのは、母乳への分泌によるものと考えられる。

本調査において、女子学生の水溶性ビタミン排泄率と比較して変動が見られたのは、妊婦ではビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>、パントテン酸が低下し、ビタミンB<sub>6</sub>、ナイアシンは増加した。授乳婦ではビタミンB<sub>2</sub>、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビタミンCの5種類であり、ナイアシンのみが増加した。本調査結果より、妊婦、授乳婦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, 921-4.
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 (2010 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. (2009).
  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 riboflavin 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 B<sub>12</sub> 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, N<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
  14. Shibata K. Ultramicro-determination of N<sup>1</sup>-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* (1987) 61, 599-604.
  15. Takahashi K, Fukuwatari T, Shibata K. Fluorometric determination of pantothenic acid in human urine by isocratic reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *J Chromatography* (2009) 877, 2168-2172.
  16. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for  $\alpha$ -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44, 361-70.
  17. 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.
  18. 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.

表 1. 被験者の身体的特徴

	女子学生 (n=74)	妊婦 (n=20)	授乳婦 (n=41)
年齢 (歳)	20.1 ± 2.3	30.3 ± 3.4	31.4 ± 3.4
身長 (cm)	158.2 ± 5.0	159.3 ± 4.8	158.7 ± 5.3
体重 (kg)	50.7 ± 5.2	54.4 ± 8.7	50.6 ± 5.1
BMI (体重 kg/身長 m <sup>2</sup> )	20.2 ± 1.7	21.4 ± 2.7	20.1 ± 1.9
栄養素等摂取量			
総エネルギー (kcal/day)	1716 ± 317	1831 ± 467	1978 ± 435
たんぱく質エネルギー比 (%)	13.6 ± 1.8	12.5 ± 3.9	13.2 ± 2.4
脂質エネルギー比 (%)	30.5 ± 4.9	26.4 ± 8.9	26.6 ± 5.7
炭水化物エネルギー比 (%)	55.9 ± 5.4	52.9 ± 15.9	57.1 ± 9.5

値は平均値 ± 標準偏差として示した。

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。

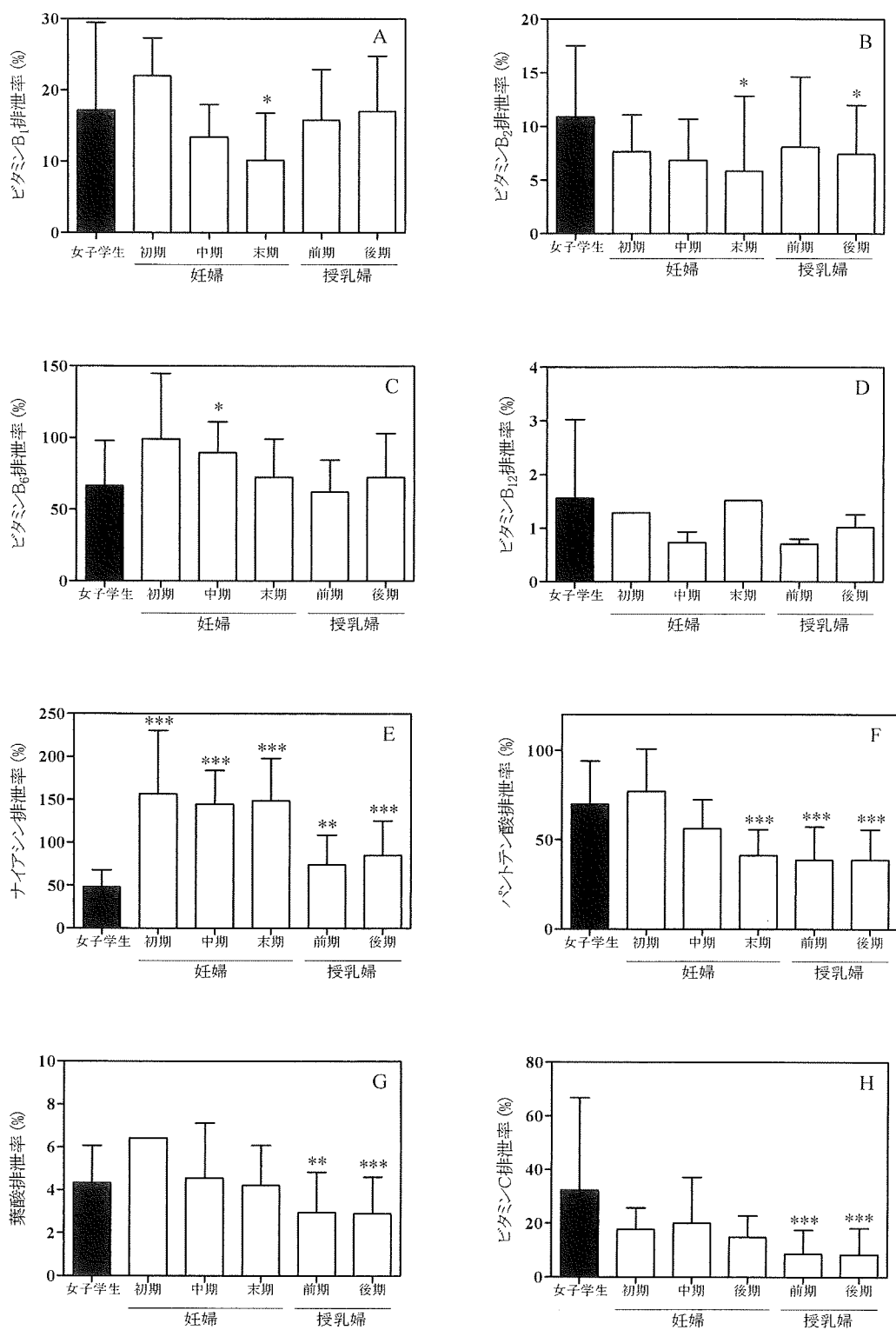


図1. 女子学生, 妊婦, 授乳婦におけるビタミンB<sub>1</sub> (A), ビタミンB<sub>2</sub> (B), ビタミンB<sub>6</sub> (C), ビタミンB<sub>12</sub> (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビタミンC (H) の尿中排泄率.

値は平均値 ± 標準偏差として示した. \*は女子学生との間に有意差があることを示す (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



平成 21 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

主任研究者の報告書

## 8. 慢性腎不全におけるビタミン栄養状態

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

### 研究要旨

腎機能が低下した状態でのビタミン栄養状態を明らかにすることを目的として、アデニン硫酸塩を投与することによって慢性腎不全ラットモデル（腎不全モデルラット）を作製し、その血中ビタミン濃度、尿中ビタミン排泄量よりビタミンクリアランスを算出した。その結果、腎不全モデルラットでは、ビタミンクリアランスが高値を示すビタミン（ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、ナイアシン）と低値を示すビタミン（ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、葉酸、パントテン酸）が存在した。特に、ナイアシンに関しては血中、肝臓中濃度が低いにも関わらず、腎不全モデルラットにおいて尿中排泄量が高値であった。一方、パントテン酸に関しては血中濃度が高値ではあるが、尿中排泄量およびクリアランスは低値であった。これらの結果より腎機能が低下した状態では腎臓におけるビタミンの再吸収および濾過機能に異常が見られること、またそれはビタミンごとにより異なることが示唆された。

## A. 目的

平成20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」で行ったストロプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラット実験にて, STZ ラットでは血中ビタミン濃度と尿中ビタミン排泄量より算出したビタミンクリアランスが高値を示すビタミンが存在することを明らかにした. つまり血中ビタミン濃度が低値を示すのは尿中に多く排泄されるためであることが示された. STZ 誘発糖尿病ラットでは, 腎機能低下も有することより, このクリアランスの上昇は腎機能低下による影響が考えられた.

本研究では, アデニン硫酸塩負荷により腎不全モデルラットを作成し, 腎機能が低下した状態での体内ビタミン栄養状態について検討した.

## B. 実験方法

### 1. 動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた. 飼育室の温度は22°C前後, 湿度は50%前後, 午前6時~午後6時を明, 午後6時~午前6時を暗とした. 3週齢雄性Wistarラットを3群に分け, Ctrl群には20%カゼイン食, Adenine群にはCtrl食に0.75%アデニン硫酸塩を添加し, PF群にはAdenine群の飼料制限食 (Ctrl食) を与え, 30日間飼育した. 飼料と水は自由摂取とし, 1日ないし2日おきの午前9時~10時に新しいものと交換した. また, その際に体重と飼料摂取量を測定した. 飼育最終日の1日尿および1日糞 (午前10時~翌日午前10時:24時間) を集めた. 飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し, 血液を採取した. 肝臓, 腎臓を摘出

し, 各臓器重量を測定した. 血液, 肝臓, 腎臓, 尿はビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub>, ビタミン B<sub>6</sub>, ビタミン B<sub>12</sub>, ナイアシン, 葉酸, パントテン酸, ビオチンの測定に使用した.

### 2. ビタミンの定量方法

全血中総 VB<sub>1</sub> 濃度, 肝総 VB<sub>1</sub> 量は, チアミン, TMP, TDP, TTP の合計量とし, HPLC による分析に供した<sup>1)</sup>. 尿中 VB<sub>1</sub> 量も HPLC により測定した<sup>1)</sup>.

全血中総 VB<sub>2</sub> 濃度, 肝総 VB<sub>2</sub> 量はリボフラビン, FMN, FAD の合計量とした<sup>2)</sup>. リボフラビン, FMN, FAD はルミフラビンに光分解し, このルミフラビン量を測定した<sup>2)</sup>. 尿中 VB<sub>2</sub> 量の測定には, 尿をそのまま試料とし, HPLC による分析に供した<sup>2)</sup>.

血漿中ピリドキサーリン酸 (PLP) 濃度を HPLC により測定した<sup>3)</sup>. 肝総 VB<sub>6</sub> 量は *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 を用いた微生物定量法により測定した<sup>4)</sup>. 尿中 VB<sub>6</sub> 量として, ピリドキシン異化代謝産物である 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) 量を HPLC により測定した<sup>5)</sup>.

血漿中 VB<sub>12</sub> 濃度, 肝 VB<sub>12</sub> 量を測定するために, VB<sub>12</sub> をシアノコバラミンに変換し, *Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法に供した<sup>6)</sup>. 尿中 VB<sub>12</sub> 量の定量も同様に, 微生物学的定量法に供した<sup>6)</sup>.

全血中総 Nam 濃度, 肝総 Nam 量を定量するために, オートクレーブによって補酵素型ナイアシンを Nam に変換し, Nam を HPLC によって測定した<sup>7)</sup>. 尿中 Nam 代謝産物量は Nam, N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミド (MNA), N<sup>1</sup>-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py), N<sup>1</sup>-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) の合計とした. 尿を HPLC 法に供し, 尿中 Nam, 2-Py, 4-Py 各含量を測定した<sup>7)</sup>.

尿中 MNA 含量を HPLC 法で測定した<sup>8)</sup>。

肝総 PaA 量を求めるために、摘出した肝臓を 37°C で 7 時間置き、自己消化によって結合型 PaA を遊離型にし、*Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に肝ホモジネートを供した<sup>9)</sup>。尿中 PaA 量の測定には尿を微生物学的定量法に供した<sup>9)</sup>。

血漿 FA 濃度の測定には、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 27773 を用いた微生物学的定量法に血漿を供した<sup>10)</sup>。肝 FA 量を測定するために、ホモジネートをコンジュガーゼとプロテアーゼで処理することによって FA をプテロイルモノグルタミン酸に変換し、微生物学的定量法に供した<sup>10)</sup>。尿中 FA 量も同様に、尿を微生物学的定量法に供した<sup>10)</sup>。

血漿総ビオチン濃度、肝総ビオチン量は、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法により測定した<sup>11)</sup>。尿中ビオチン量を測定するために、尿を微生物学的定量法に供した<sup>11)</sup>。

### 3. 血中および尿中臨床パラメーターの測定

血漿中グルコースおよび BUN、クレアチニンの測定は、富士ドライケム (株) 富士フィルムを用いて測定した。

### 4. ビタミンクリアランスの算出

ビタミンクリアランス (mL/min) は、24 時間尿中ビタミン排泄量 / { 血中ビタミン濃度 × 1440 (min) } から算出した。

### 5. 統計処理

数値はすべて平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した。値の比較には一元配置分散分析を用い、有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った。p 値が 0.05 以下のとき統計的有意差があるものとした。計算には GraphPad Software 社 (San Diego, CA, USA) の GraphPad Prism 4 を使用した。

## C. 結果

### 1. 腎不全モデルラットにおける体重増加量・飼料摂取量および臓器重量の変化

実験期間中の飼料摂取量、体重増加量を図 1 に示した。体重増加量、飼料摂取量において、Ctrl 群と Adenine 群、PF 群との間にそれぞれ約 1.0 倍、1.8 倍の差が認められた。一方、Adenine 群が摂取した飼料を与えた PF 群は体重増加量、飼料摂取量ともに差は認められなかった。

### 2. 臓器重量、血液および尿中臨床パラメーター

肝臓の重量は Ctrl 群に比べ、Adenine 群で減少し、Adenine 群と PF 群間には差は認められなかった。一方、腎臓の重量は、Ctrl 群と PF 群間には差はなく、Adenine 群では PF 群の約 3.0 倍であった。また、BUN、血漿クレアチニン、尿中クレアチニン値より Ctrl 群、PF 群に比べ Adenine 群において腎機能の低下が認められた。(表 1)

### 2. 血液中ビタミン濃度

血液中のビタミン濃度を図 2 に示した。PF 群に比べ Adenine 群において低値を示したビタミンは、ビタミン B<sub>6</sub>、ナイアシン、葉酸であった。一方、高値を示したビタミンは、ビタミン B<sub>2</sub>、パントテン酸であり、パントテン酸に関しては Adenine 群で PF の約 2.6 倍であった。ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、ビオチンに関しては 2 群間で差は認められなかった。

### 3. 肝臓中ビタミン濃度

肝臓中のビタミン濃度を図 3 に示した。PF 群に比べ Adenine 群において低値を示したビタミンは、ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、ナイアシン、パントテン酸、ビオチンであった。一方、高値を示したビタミンは、ビタミン

B<sub>6</sub>, 葉酸であった。

#### 4. 尿中ビタミン排泄量

尿中ビタミン排泄量を図 4 に示した。PF 群に比べ Adenine 群において低値を示したビタミンは、ビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub>, 葉酸, パントテン酸であった。一方, ナイアシンのみ高値を示した。ビタミン B<sub>6</sub>, ビタミン B<sub>12</sub>, ビオチンに関して差は認められなかった。

#### 5. ビタミンクリアランス

ビタミンクリアランスを図 5 に示した。PF 群に比べ Adenine 群において低値を示したビタミンは、ビタミン B<sub>1</sub>, ビタミン B<sub>2</sub>, 葉酸, パントテン酸であった。一方, ビタミン B<sub>6</sub>, ビタミン B<sub>12</sub>, ナイアシンに関しては 2 群間で Adenine 群にてそれぞれ約 1.8 倍, 2.7 倍, 4.8 倍高値を示した。ビオチンに関しては, 2 群間で差は認められなかった。

#### D. 考察

ラットにアデニン硫酸塩を長期 (約 30 日間) 投与することにより直線的に高窒素血症が進行し, 腎結石や尿路結石を形成する。これがヒトの腎不全末期に似ていることより慢性腎不全モデルとして汎用されている<sup>12-14)</sup>。

本研究にて腎不全モデルラットでは, クリアランスが低値を示すビタミンが存在した。これは, STZ ラット実験から得られた結果に反する。一方, ビタミン B<sub>6</sub>, ビタミン B<sub>12</sub>, ナイアシンのクリアランスは腎不全モデルラットにて高値を示した。しかしながらビタミン B<sub>12</sub> の主要な排泄経路は尿ではないため単純にクリアランスで判断することはできないと考える。Yokozawa<sup>14)</sup>らは, アデニン硫酸塩長期投与ラットにおいて, 結晶成分が尿管腔主に近位尿管を中心に沈着するが腎糸球体への沈着は認められないことを明

らかにしている。つまり, 腎不全モデルラットでは糸球体機能は比較的維持されているが, 腎尿管機能, 特に腎における再吸収機能が低下していることが考えられる。本研究より, ビタミン B<sub>6</sub>, ナイアシンに関してはその影響を鋭敏に反映しており, 再吸収に関わるトランスポーターの発現が関与している可能性が考えられる。これまでの STZ ラットにおけるビタミンクリアランスの上昇は, 腎尿管における再吸収能よりは, むしろ糸球体における過剰濾過による影響を大きく受けることが示唆された。

#### 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 (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. 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.
2. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* (1983) 258, 5623-8.
  3. Rybak ME, Pfeiffer CM. Clinical analysis of vitamin B<sub>6</sub>: determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Anal Biochem* (2004) 333, 336-44.
  4. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 17<sup>th</sup> ed., (2000) AOAC Inc, Arlington, VA, USA, 55-7.
  5. Gregory JF 3<sup>rd</sup>, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979) 32, 879-83.
  6. 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 B<sub>12</sub> degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* (1998) 46, 5177-80.
  7. Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N<sup>1</sup>-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* (1988) 424, 23-8.
  8. 柴田克己. 高速液体クロマトグラフィーによる尿中 N<sup>1</sup>-メチルニコチンアミドの超微量定量方法. *ビタミン* (1987) 61, 599-604.
  9. Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* (1944) 156, 21-6.
  10. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for  $\alpha$ -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998) 44, 361-70.
  11. 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.
  12. Bendich A, Brown GB, Philips FS, Thiersch JB. The direct oxidation of adenine in vivo. *J Biol Chem* (1950) 183, 267-277.
  13. Philips FS, Thiersch JB, Bendich A. Adenine intoxication in relation to in vivo formation and deposition of 2,8-dioxyadenine in renal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* (1952) 104, 20-30.
  14. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* (1986) 44, 230-4.

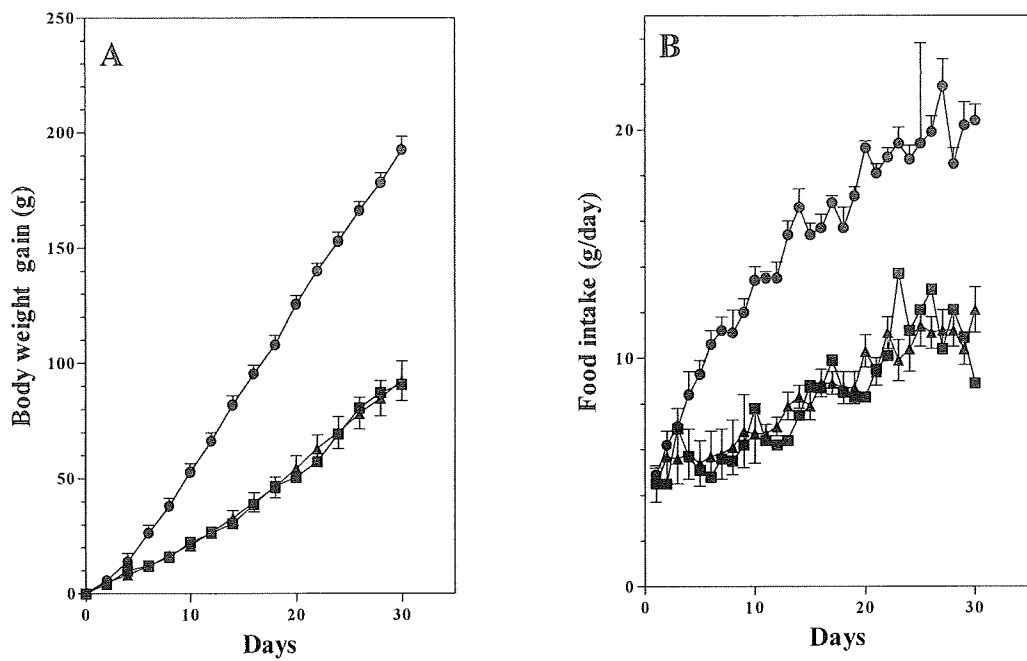


図 1. Adenine 投与における体重増加量 (A) および飼料摂取量 (B) の変化

● : Ctrl 群, ■ : PF 群, ▲ : Adenine 群.

値は平均値 ± 標準偏差で示した.

表 1 臓器重量, 血液および尿中臨床パラメーター

項目	Ctrl 群	PF 群	Adenine 群
肝臓重量 (g)	9.86 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.24 ± 0.03 <sup>b</sup>	5.02 ± 0.23 <sup>b</sup>
腎臓重量 (g)	1.83 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.45 ± 0.13 <sup>b</sup>
BUN (mM)	7.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	31.8 ± 2.9 <sup>b</sup>
血漿クレアチニン (mM)	0.28 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>b</sup>
尿中クレアチニン (mg/day)	9.61 ± 0.45 <sup>a</sup>	5.67 ± 0.21 <sup>b</sup>	4.84 ± 0.25 <sup>c</sup>
Ccr (mg/min)	0.21 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>b</sup>

値は平均値 ± 標準誤差として示した. 異なる添え字は有意差を示す.

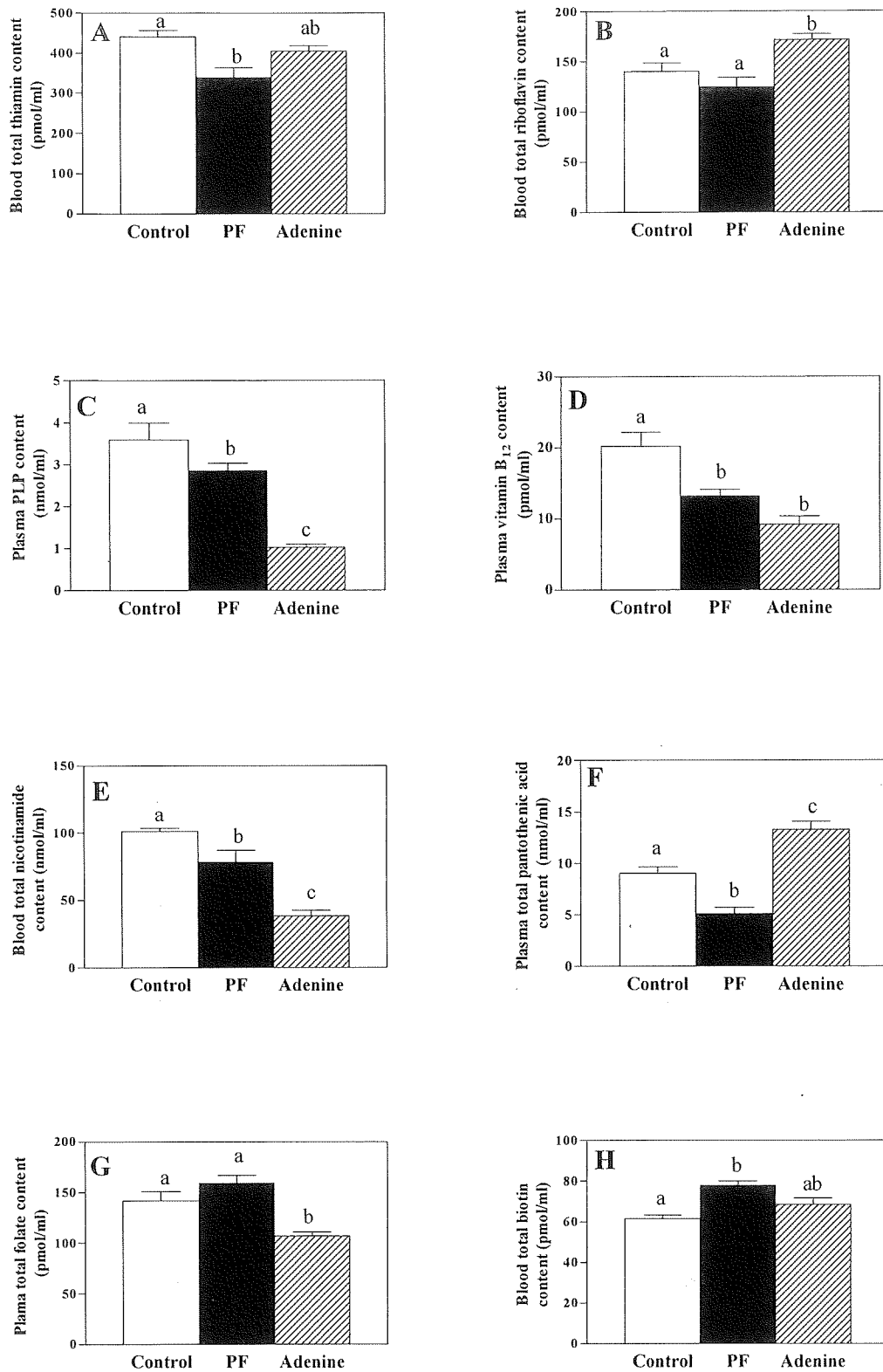


図2. 血中ビタミンB<sub>1</sub> (A), ビタミンB<sub>2</sub> (B), ビタミンB<sub>6</sub> (C), ビタミンB<sub>12</sub> (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) 濃度.

値は平均値 ± 標準誤差として示した. 異なる添え字は有意差を示す.



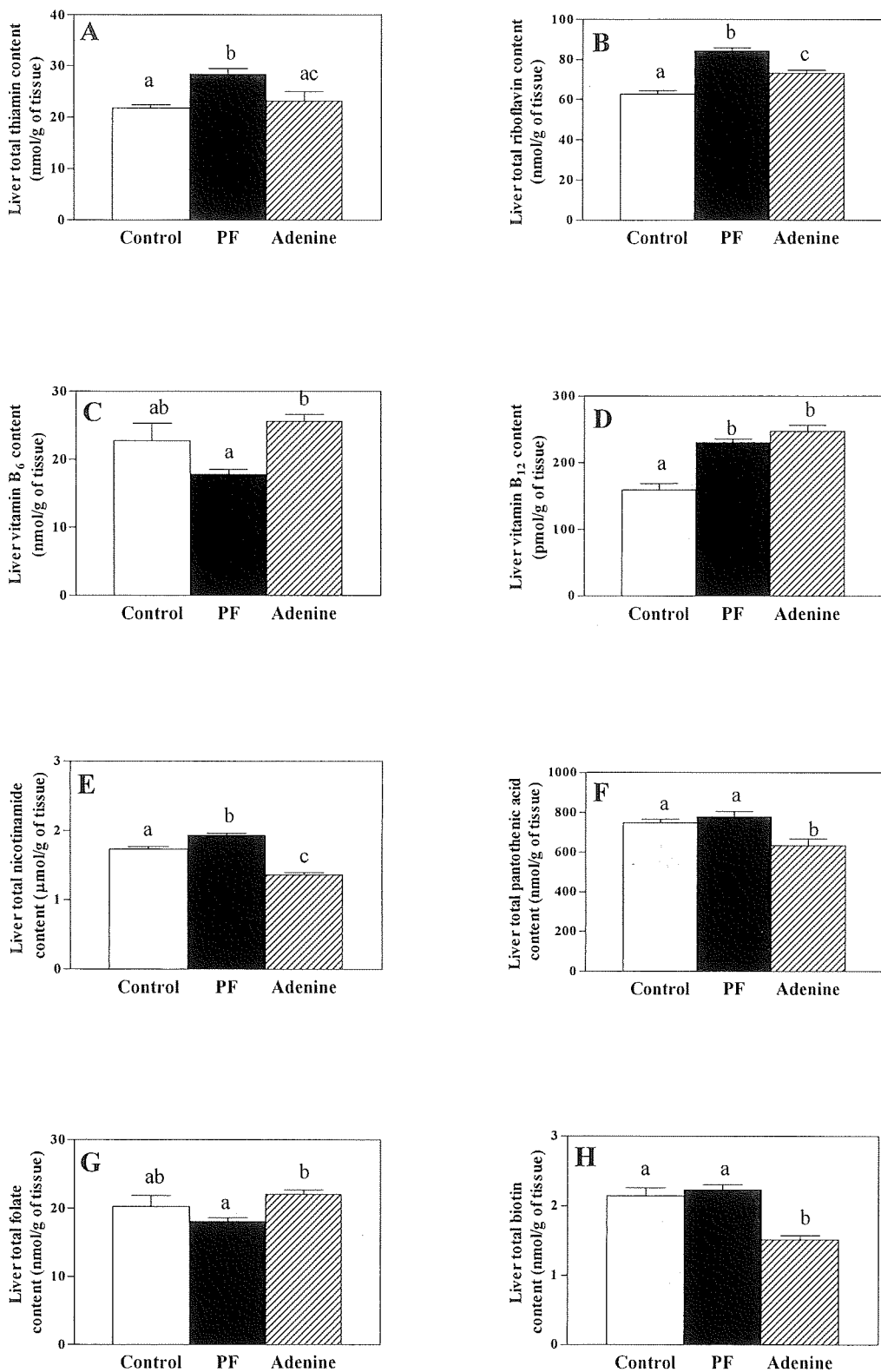


図3. 肝臓中ビタミンB<sub>1</sub> (A), ビタミンB<sub>2</sub> (B), ビタミンB<sub>6</sub> (C), ビタミンB<sub>12</sub> (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) 濃度。  
 値は平均値 ± 標準誤差として示した。異なる添え字は有意差を示す。

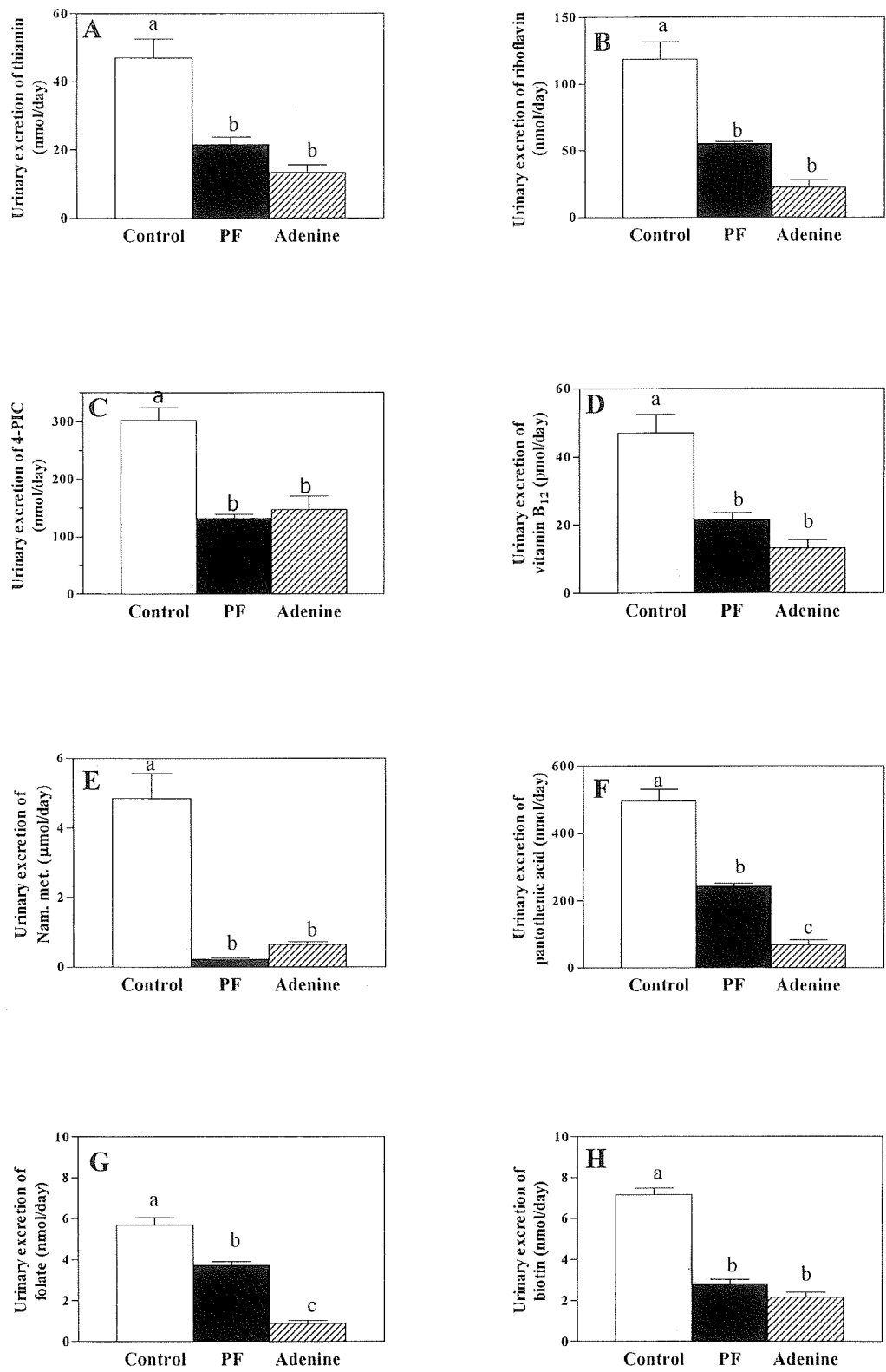


図4. 尿中ビタミンB<sub>1</sub> (A), ビタミンB<sub>2</sub> (B), ビタミンB<sub>6</sub> (C), ビタミンB<sub>12</sub> (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) 排泄量.

値は平均値 ± 標準誤差として示した. 異なる添え字は有意差を示す.

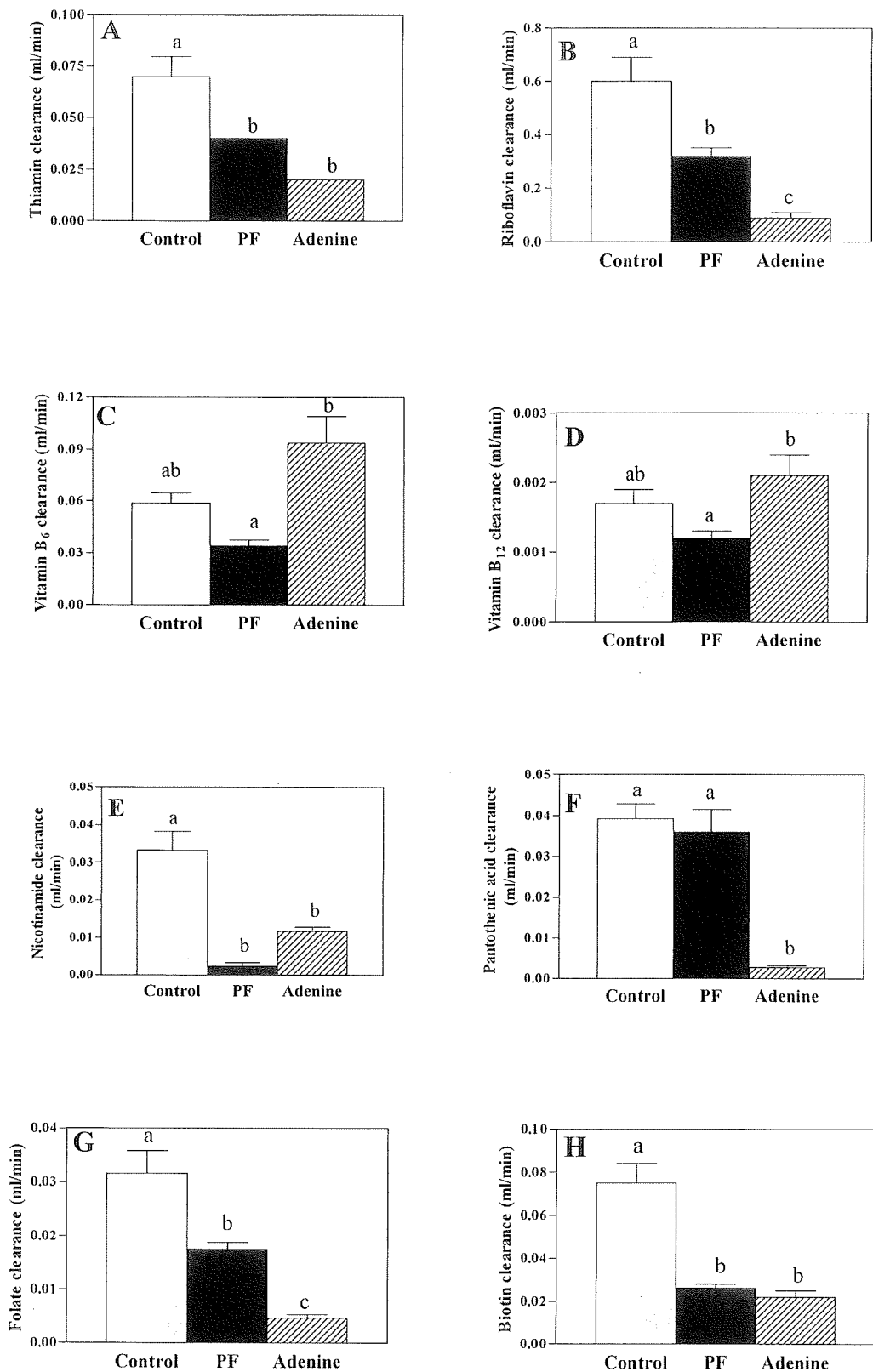


図5. ビタミンB<sub>1</sub> (A), ビタミンB<sub>2</sub> (B), ビタミンB<sub>6</sub> (C), ビタミンB<sub>12</sub> (D), ナイアシン (E), パントテン酸 (F), 葉酸 (G), ビオチン (H) クリアランス。値は平均値 ± 標準誤差として示した。異なる添え字は有意差を示す。

平成 21 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

主任研究者の報告書

9. 非肥満インスリン非依存型糖尿病ラットに  
おけるビタミン量が血糖値におよぼす影響

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

持続する高血糖状態を示す糖尿病では、糖代謝異常であり糖質代謝に関わるビタミンであるビタミン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ナイアシンの必要量が高まると考えられる。しかし現在の食事摂取基準では糖尿病に対してビタミンの付加量は設けられていない。本研究では、非肥満非インスリン依存性糖尿病ラット（GK ラット）におけるビタミン量が血糖値におよぼす影響について検討した。3 週齢雄性 Wistar 系ラット、GK ラットにそれぞれ飼料 1 kg 中にビタミン混合を 0.3%, 1.0% 含む食餌を与え、約 7 週間飼育した。その間、週おきの血糖値測定および 2 回の経口ブドウ糖負荷試験を行った。結果、非肥満非インスリン依存性糖尿病ラットにおいてビタミン量の違いによる血糖上昇抑制効果は認められなかった。よって、遺伝的に糖尿病になるリスクを有するものでは、二次予防としてのビタミン負荷は有効ではないことが示唆された。