

II. 研究分担者の報告書

4. たんぱく質の出納と生活習慣病関連の検討解析

研究分担者 木戸 康博 京都府立大学大学院生命環境科学研究科 教授

研究要旨

【目的】指標アミノ酸酸化法（IAAO 法）は、 ^{13}C 標識指標アミノ酸を用いて、たんぱく質の代謝要求量を算出する新しい方法である。本研究では、IAAO 法が、日本人成人男性のたんぱく質必要量の算出方法として有用であるか検討することを目的とした。

【方法と結果】健康な成人男性を被験者とした。実験 I と III では、被験者は 11 時間の絶食後、午前 9 時より実験を開始した。呼気バックにて回収した呼気は、赤外線分光分析装置 POCone（大塚電子株式会社）を用いて呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した。

実験 1: 被験者は、実験開始から 3 時間ごとに、エネルギー量（REE \times 1.5 kcal）とたんぱく質量（1.0 g/kg BW）を 1 日摂取量の 1/8 または 3/16 とした実験食を摂取した。実験開始から終了まで 1 時間ごとに呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した。その結果、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、エネルギー摂取量に関わらず、13 時の値と比較し、それ以降有意な変化を認めなかった。 ^{13}C 標識物質を経口摂取した場合、実験開始 240 分後以降、 ^{13}C 標識物質の経口摂取に影響を受けた呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定できると考えられた。

実験 2: 被験者は、食後 120 分以上経過した状態で、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を 0.176 mg/kg BW 経口摂取した。経口摂取前から経口摂取後 60 分までの 10 分ごと、90 分、120 分に呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した。その結果、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 経口摂取後 10 分前後に最大値となり、その後経時的に速やかに減少し、60 分以降には経口摂取前と比較し有意な差を認めなかった。体内で発生した CO_2 は、呼気として速やかに排出されることが示唆された。

実験 3: 被験者は、実験開始から 1 時間ごとに、エネルギー量（REE \times 1.5 kcal）とたんぱく質量（0.2、0.4、0.8、1.0 g/kg BW）を 1 日の摂取量の 1/12 とした実験食を摂取した。13 時の食事の際に、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を 0.176 mg/kg BW および ^{13}C -Phe を 0.66 mg/kg BW 経口摂取した。14 時から 16 時の食事の際には、 ^{13}C -Phe を 1.2 mg/kg BW 経口摂取した。13 時～17 時まで 30 分ごとに呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した。16 時 30 分に血液を採取した。その結果、 ^{13}C 標識物質の経口摂取開始 210 分後の 16 時 30 分の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、たんぱく質摂取量依存的に減少する傾向がみられた。血中 Phe および Tyr の $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 比にたんぱく質摂取量による差は認めなかった。これらのことより、たんぱく質摂取量を増すことでアミノ酸のたんぱく質合成への利用量も増し、

呼吸への排出量が減少したと考えられた。日本人成人男性においても、IAAO 法による呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の変化からたんぱく質の不足や充足を評価できると考えられた。

【結論】たんぱく質摂取レベルを増して IAAO 法を行うことで呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の変曲点が明らかになる可能性が示唆された。

A. 目的

たんぱく質必要量の算定には、これまで窒素出納法が用いられてきた^{1,2)}。窒素出納法は、食事等からの摂取窒素量と、皮膚表面や尿、糞等からの排泄窒素量を調べ、その窒素平衡維持量をたんぱく質必要量としている。窒素出納法は、たんぱく質栄養研究に最も標準的かつ有効な方法として用いられているが、出納値が正に傾きやすいことや³⁾、被験者および測定者への負担が大きいことが指摘されている。そこで、より簡便な測定法の確立が望まれている。

指標アミノ酸酸化 (indicator amino acid oxidation : IAAO) 法は、近年新しく開発された ^{13}C 標識アミノ酸酸化法の 1 つである。体内で必要とするたんぱく質が、過不足なく合成されるには、たんぱく質の構成アミノ酸が、全て揃っている必要がある。体内で必要とするたんぱく質の合成は、第一制限アミノ酸量に依存しているため、摂取する第一制限アミノ酸の量が少なければ、たんぱく質合成に利用されなかった他のアミノ酸の余剰分がエネルギーとして利用され、二酸化炭素 (CO_2) として呼気中へ排出される。一方、第一制限アミノ酸の摂取量が増すと、他のアミノ酸のたんぱく質合成への利用量も増加し、アミノ酸の分解によって発生する CO_2 の呼気中への排出量も減少する。IAAO 法は、このアミノ酸代謝の反応を利用し、 ^{13}C 標識物質を経口摂取し、発生する ^{13}C -二酸化炭素 ($^{13}\text{CO}_2$)

量を測定するものである⁴⁾。Humayun ら⁵⁾は、成人男性のたんぱく質必要量の測定方法に IAAO 法を応用した。IAAO 法は、実験期間が短期間であること、被験者および測定者への負担が少ないことから、たんぱく質必要量をより簡便に算出する方法ではないかと考えられている。

本研究では、IAAO 法によるたんぱく質必要量算出のための条件検討および Humayun ら⁵⁾の実験方法を用いた日本人成人男性を対象とする IAAO 法を行った。まず、 ^{13}C 標識物質を経口摂取しない状態で、食事摂取により発生した $^{13}\text{CO}_2$ の呼気中排出量の安定性について検討した。次に ^{13}C -炭酸水素ナトリウム ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) の経口摂取により発生した $^{13}\text{CO}_2$ が呼気中に排出されるまでの経過について検討した。この基礎研究をもとに、先行研究⁵⁾と同様の実験プロトコールで IAAO 法による呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量測定をし、日本人成人男性においても同様の結果が得られるか検討した。なお、この検討では、たんぱく質源にアミノ酸混合物を用い、4 種類のたんぱく質摂取レベルで呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した。また、たんぱく質の摂取量と ^{13}C -フェニルアラニン (^{13}C -Phe) の経口摂取が、血中フェニルアラニン (Phe) およびチロシン (Tyr) 濃度に影響を与えているかについても検討した。

実験 1. 食事摂取後の呼気中 ^{13}C 量の安定性に関する検討

1. 目的

自然界には約 1% の割合で ^{13}C が存在する。そのため、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、摂取する食事の影響を受ける。ヒトでは、アミノ酸混合物を実験食として 1 時間ごとに摂取すると、約 225 分後から呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ 量が一定になることが報告されている⁶⁾。そこで、 ^{13}C 標識物質を摂取しない状態で、実験食摂取後の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の安定性について検討した。

2. 方法

本研究は、京都府立大学倫理委員会の承認を得たうえで行った。

1) 被験者

健康な成人男性、延べ 10 名を被験者とした。各被験者の特徴を表 1 に示した。被験者は、実験前日の激しい運動およびアルコールの摂取を避けた。22 時以降は水、お茶および紅茶以外は摂取せず、実験開始まで 11 時間絶食とした。実験中は安静とした。

2) 実験食

1 回の食事での摂取量は、1 日のエネルギー摂取量およびたんぱく質摂取量の 1/8 または 3/16 とした。エネルギー摂取量は、18 歳から 29 歳男性の基礎代謝基準値 24.0 kcal/kg BW/日に、個人の体重および身体活動レベル I の 1.50 を乗じて算出した⁷⁾。たんぱく質摂取量は体重 1 kg あたり 1.0 g として算出した。たんぱく質源には、アミノ酸価が 100 であり、アミノ酸組成が理想的な鶏卵を用いた (表 2)。食事は、たんぱく質源に玉子焼き、玉子焼き以外のエネルギー源には、ういろうおよび粉あめを用いた。玉子焼きは、1 食分にキャノーラ油 3 g およびスクロース 3 g を含み、エネルギー量を表 3 のとおり調整した。ういろうは、コーンスターチとスクロースの重量比を 3:4 とし作成した (表 4)。水を追加しながら混ぜ合わせ、こし器でこしたものを沸騰するまで加熱した。その後、型に移し 30 分蒸した。蒸しあがったういろうの重量を量り、必要エネルギー分を切り分けた。粉あめは 1 食のエネルギー摂取量が 1/8 の時は 12.5 g (50 kcal)、3/16 の時は 25.0 g (100 kcal) を紅茶に溶かして摂取した。

表 1. 被験者の特徴

被験者	年齢	体重	身長	BMI
A	23 歳	54 kg	170 cm	18.6
B	22 歳	63 kg	173 cm	21.0
C	22 歳	68 kg	177 cm	21.2
D	23 歳	69 kg	173 cm	23.1
E	22 歳	79 kg	192 cm	21.5

表 2. 鶏卵のアミノ酸組成

アミノ酸	mg / g Protein	アミノ酸	mg / g Protein
Ala	61.4	Leu	83.3
Arg	75.1	Lys	75.7
Asn	33.3	Met	29.6
Asp	33.3	Phe	54.7
Cys	22.1	Pro	41.9
Gln	56.6	Ser	83.9
Glu	56.6	Thr	47.1
Gly	33.3	Typ	15.6
His	22.7	Tyr	40.7
Ile	62.8	Val	70.3

表 3-1. 1食の摂取量が1日の1/8量の玉子焼きの栄養成分組成 (体重 60 kg)

	重量 (g)	エネルギー (kcal)	たんぱく質 (g)	脂質 (g)	糖質 (g)
鶏卵	61	92	7.5	6.3	0.2
スクロース	3	12	0	0	3
キャノーラ油	3	28	0	3	0
合計	67	132	7.5	9.3	3.2

表 3-2. 1食の摂取量が1日の3/16での玉子焼きの栄養成分組成 (体重 60 kg)

	重量 (g)	エネルギー (kcal)	たんぱく質 (g)	脂質 (g)	糖質 (g)
鶏卵	92	139	11.3	9.5	0.3
スクロース	3	12	0	0	3
キャノーラ油	3	28	0	3	0
合計	98	179	11.3	12.5	3.3

表 4. ういろうの栄養成分組成

	重量 (g)	エネルギー (kcal)	たんぱく質 (g)	脂質 (g)	糖質 (g)
コーンスターチ	3	11	0	0	2.6
スクロース	4	15	0	0	4
合計	7	26	0	0	6.6

3) 実験プロトコール

9時より実験を開始し、9時、12時および15時に実験食を摂取した。また、9時から18時まで1時間ごとに呼気採取バックにて呼気を回収し、赤外線分光分析装置 POcone (大塚電子株式会社) にて呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した (表 5)。

3. 結果

結果は、9時の値を Pre 値とし、(測定値 - Pre 値) / kg BW を算出し、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ (‰) / kg

BW により呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的变化を示した (図 1)。

1食の摂取量を1日の1/8とした時の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、実験開始240分後の13時と比較し、それ以降、実験終了まで有意な変化を認めなかった。1食の摂取量を1日の3/16とした時も、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、実験開始240分後の13時以降と比較し、それ以降、実験終了まで有意な変化を認めなかった。呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量はエネルギー摂取量に関わらず、実験開始240分後以降安定し、15時に摂取した食事の影響は、受けなかったことが示された。

表 5. 実験プロトコール

時刻	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
実験食	■			■		■	■			
Breath sample	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇

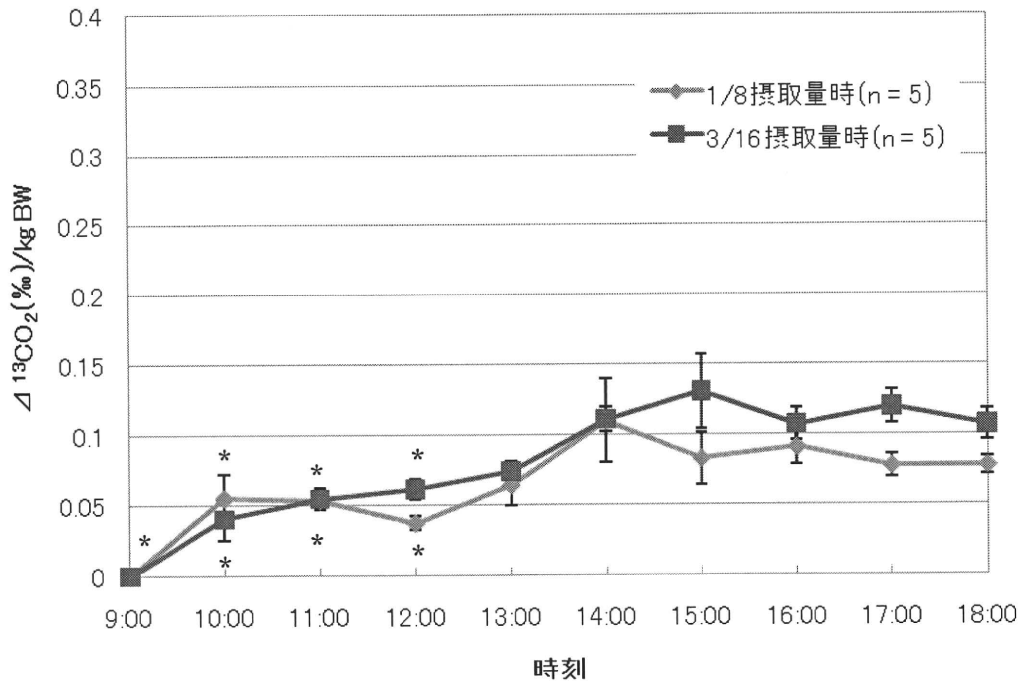


図 1. 食事摂取後の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的变化

結果は mean \pm SE で示した。 * $P < 0.05$ vs 13:00

実験 2. ^{13}C -炭酸水素ナトリウム経口摂取後、呼気への $^{13}\text{CO}_2$ 排出に関する検討

1. 目的

IAAO 法において、 ^{13}C 標識物質として経口摂取する ^{13}C -Phe は、体内に吸収され、分解された後、 $^{13}\text{CO}_2$ と水 (H_2O) に代謝される。体内で発生した $^{13}\text{CO}_2$ は、血液中では水素イオン (H^+) と重炭酸イオン (HCO_3^-) として存在する。肺では、 H_2O と $^{13}\text{CO}_2$ となり、 $^{13}\text{CO}_2$ が呼気として体外に排出される。また、経口摂取した ^{13}C -炭酸水素ナトリウム ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) は体内に吸収されると、血液中で Na^+ と HCO_3^- として存在する。その後、 HCO_3^- は $^{13}\text{CO}_2$ として呼気中へ排出される。そこで本研究では、経口摂取した $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ が体内に吸収されてから呼気中に $^{13}\text{CO}_2$ として排出されるまでの過程を経時的に検討した。

2. 方法

本研究は、京都府立大学倫理委員会の承認を得たうえで行った。

1) 被験者

健康な成人男性 7 名を被験者とした。各被験者の特徴を表 6 に示した。被験者は、食後 120 分以上経過した状態で実験を開始した。実験中は安静とした。

2) 実験プロトコール

被験者は、食後 120 分以上経過した状態で体重 1 kg あたり 0.176 mg の $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を経口摂取した。 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 経口摂取前、経口摂取後 10 分、20 分、30 分、40 分、50 分、60 分、90 分、120 分に呼気採取バックにて呼気を回収し、赤外線分光分析装置 POCone (大塚電子株式会社) にて呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した (表 7)。

表 6. 被験者の特徴

被験者	年齢	体重	身長	BMI
A	21 歳	46 kg	157 cm	18.7
B	23 歳	54 kg	170 cm	18.6
C	26 歳	63 kg	174 cm	20.8
D	52 歳	64 kg	163 cm	24.1
E	39 歳	66 kg	172 cm	22.3
F	23 歳	67 kg	177 cm	21.4
G	44 歳	78 kg	172 cm	26.4

表 7. 実験プロトコール

Time (min)	0	10	20	30	40	50	60	90	120
$\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$	◎								
Breath sample	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇

3. 結果

結果は、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 経口摂取前の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を Pre 値とし、 $(\text{測定値} - \text{Pre 値}) / \text{kg BW}$ を算出し、 $\Delta ^{13}\text{CO}_2$ (‰) / kg BW により呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的変化を示した (図 2)。

呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、経口摂取前と比較し経口摂取後、急激に増加し、10 分後に最大とな

った。その後は、経時的に速やかに低値となった。最大値を示した 10 分値は Pre 値との間に統計的に有意な差を認めなかった。これは、個人により最大値となる時間が経口摂取後 10 分前後で違ったためと考えられた。経口摂取後 60 分から 120 分にかけての呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量には Pre 値との有意な差を認めなかった。

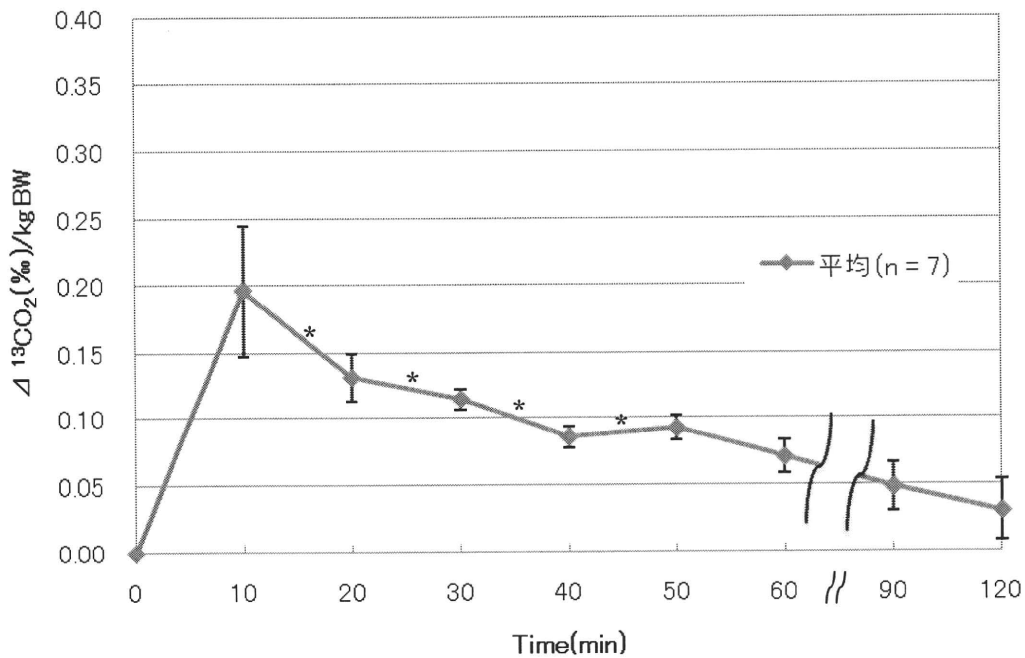


図 2. $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 経口摂取後の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的変化
結果は mean ± SE で示した。 * $P < 0.05$ vs 0 min

実験 3. アミノ酸混合物をたんぱく源とした IAAO 法による呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の検討

1. 目的

体内では、摂取するたんぱく質量が少なければ、第一制限アミノ酸の量が少なくなり、たんぱく質合成に利用されなかった余剰のアミノ酸はエネルギー源として利用され、アミノ酸のカルボキシル基は、 CO_2 として呼気中に排出される。摂取するたんぱく質量を増すと第一制限アミノ酸の量が増えるので、他のアミノ酸もたんぱく質合成へ利用され、アミノ酸の分解により発生する CO_2 の呼気中への排出量は減少すると考えられる。IAAO 法はこのアミノ酸代謝の反応を利用したものである。指標アミノ酸として $^{13}\text{C-Phe}$ を一定量経口摂取し、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の変化よりたんぱく質必要量を評価できる。そこで本研究では、アミノ酸混合物をたんぱく質源とし

た IAAO 法を行い、たんぱく質摂取量の違いによる呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ 量の変化について検討した。また、血中の ^{12}C -フェニルアラニン ($^{12}\text{C-Phe}$) と $^{13}\text{C-Phe}$ および ^{12}C -チロシン ($^{12}\text{C-Tyr}$) と ^{13}C -チロシン ($^{13}\text{C-Tyr}$) 濃度を測定し、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量との関係についても検討した。

2. 方法

本研究は、京都府立大学倫理委員会の承認を得たうえで行った。

1) 被験者

健康な成人男性延べ 19 名を被験者とした。各被験者の特徴を表 8 に示した。被験者は、実験前日の激しい運動及びアルコールの摂取を避けた。22 時以降は水、お茶および紅茶以外は摂取せず、実験開始まで 11 時間絶食とした。実験中は安静とした。

表 8-1. 被験者の特徴 (たんぱく質摂取量 0.2 g/kg BW)

被験者	年齢	体重	身長	BMI
A	23 歳	54 kg	170 kg	18.7
B	22 歳	57 kg	174 kg	18.8
C	23 歳	67 kg	177 kg	21.4

表 8-2. 被験者の特徴 (たんぱく質摂取量 0.4 g/kg BW)

被験者	年齢	体重	身長	BMI
A	23 歳	54 kg	170 kg	18.7
D	21 歳	60 kg	170 kg	20.8
E	20 歳	61 kg	172 kg	20.6
C	23 歳	67 kg	177 kg	21.4
F	23 歳	80 kg	192 kg	21.6

表 8-3. 被験者の特徴 (たんぱく質摂取量 0.8 g/kg BW)

被験者	年齢	体重	身長	BMI
A	23 歳	54 kg	170 cm	18.7
D	21 歳	60 kg	170 cm	20.8
G	23 歳	63 kg	173 cm	21.0
C	23 歳	67 kg	177 cm	21.4

表 8-4. 被験者の特徴 (たんぱく質摂取量 1.0 g/kg BW)

被験者	年齢	体重	身長	BMI
H	21 歳	53 kg	176 cm	17.1
A	23 歳	54 kg	170 cm	18.7
B	22 歳	57 kg	174 cm	18.8
D	21 歳	60 kg	170 cm	20.8
I	22 歳	60 kg	170 cm	20.8
E	20 歳	61 kg	172 cm	20.6
C	23 歳	67 kg	177 cm	21.4

2) 実験食

1 回の食事での摂取量は、1 日のエネルギー摂取量およびたんぱく質摂取量の 1/12 とした。エネルギー摂取量は、18 歳から 29 歳男性の基礎代謝基準値 24.0 kcal/kg BW /日に個人の体重および身体活動レベル I の 1.50 を乗じて算出した⁷⁾。たんぱく質摂取量は、体重 1 kg あたり、0.2 g、0.4 g、0.8 g、1.0 g のいずれかとした。食事は、たんぱく質源にアミノ酸混合物、エネルギー源にはういろろ、粉あめ 12.5 g (50 kcal)

およびオリーブ油を用いた。アミノ酸混合物は、Phe と Tyr 以外の 18 種類のアミノ酸粉末を鶏卵たんぱく質のアミノ酸組成に従い混合した。混合したアミノ酸粉末は、乳鉢ですり潰し、粒子の大きさを均一にした。たんぱく質摂取量ごとに含まれるアミノ酸組成を表 9 に示した。全てのたんぱく質摂取レベルで体重 1 kg あたり Phe と Tyr はそれぞれ 30.5 mg と 40.7 mg とした。ういろろは、実験 I と同様の組成で作成した。粉あめは、紅茶に溶かして摂取した。

表 9. 体重 1 kg あたりの各たんぱく質摂取量中に含まれるアミノ酸量

		たんぱく質摂取量			
		mg/0.2 g	mg/0.4 g	mg/0.8 g	mg/1.0 g
ア ミ ノ 酸	Trp	3.1	6.2	12.5	15.6
	Ser	16.8	33.6	67.1	83.9
	Leu	16.7	33.3	66.6	83.3
	Lys	15.1	30.3	60.6	75.7
	Arg	15	30	60.1	75.1
	Val	14.1	28.1	56.2	70.3
	Ile	12.6	25.1	50.2	62.8
	Ala	12.3	24.6	49.1	61.4
	Gln	11.3	22.6	45.3	56.6
	Glu	11.3	22.6	45.3	56.6
	Phe	30.5	30.5	30.5	30.5
	Thr	9.4	18.8	37.7	47.1
	Pro	8.4	16.8	33.5	41.9
	Tyr	40.7	40.7	40.7	40.7
	Asn	6.7	13.3	26.6	33.3
	Asp	6.7	13.3	26.6	33.3
	Gly	6.7	13.3	26.6	33.3
	Met	5.9	11.8	23.7	29.6
	His	4.5	9.1	18.2	22.7
Cys	4.4	8.8	17.7	22.1	

3) 実験プロトコール

9時より実験を開始し、9時から16時まで1時間ごとに実験食を摂取した。13時の食事の際に、体重1kgあたり $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を0.176 mg、 ^{13}C -Pheを0.66 mg経口摂取した。14時から16時の食事の際には、体重1kgあたり1.2 mgの ^{13}C -Pheを経口摂取した。9時および13時から17時までの30分ごとに呼気採取バッグにて呼気を回収し、赤外線分光分析装置 POcone (大塚電子株式会社)にて呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定した(表10)。たんぱく質摂取量が体重1kgあたり0.4 gおよび0.8 g時のみ血中PheおよびTyrの濃度測定のため、16時30分に採血をした。

4) 血液サンプルのPheおよびTyr濃度の測定

被験者より採取した血液は、直ちに遠心分離し(12,000 rpm、15 min、4°C)、血漿画分と血球画分に分けた。血漿画分を-80°Cで使用するまで保存した。自然解凍した血漿画分に、エタノールを添加、75%エタノールとし、除たんぱく処理をした。これを再び遠心分離し(12,000 rpm、30 min、4°C)、上清をエタノール可溶画分として実験に用いた。

次に、血液中のPheおよびTyrのキャプチャリングのため、 H^+ 型強カチオン交換樹脂を充填したスピнкаラムによる固相抽出を行った。この分画はAito-Inoueら⁸⁾の方法を用いた。

H^+ 型の強カチオン交換樹脂(AG50W×8)をビーカーに適量とり、50%メタノールで数回洗浄した。そして、ミニスピнкаラム(Ultrafree-MC, Durapore PVDF 5.0 μm, MILLIPORE)に50%メタノールとともに

充填後、メタノールを溶出させるため、12,000 rpmで数秒間遠心分離した。さらに、200 μLの50%メタノールをカラムに3回添加し洗浄した後、200 μLの10 mM HClで3回カラムを平衡化した。ここまでの溶出液は捨てた。このミニスピнкаラムに除たんぱく処理を行った血液サンプルを800 μL注入し、溶出した。その後、200 μLの50%メタノールで2回洗浄した。この溶出液は捨てた。そして、800 μLの7.5 Nアンモニア50%メタノールで2回抽出を行った。これらの溶出液をサンプルごとにまとめ、吸着画分とした。分画終了後、直ちに吸着画分を水流ポンプにて遠心真空乾固した。

次に6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate : AQCによる誘導化を行った。5倍希釈したアミノ酸混合溶液H型を1.5 mLマイクロチューブに10 μL注入した。サンプルは目的の濃度まで希釈したものを1.5 mLマイクロチューブに10 μL注入し、遠心濃縮器にて遠心真空乾固した。その後、アミノ酸混合溶液H型には、20 mM HClを20 μL、ホウ酸緩衝液を70 μL、AQC試薬を10 μL添加した。サンプルには、20 mM HClを20 μL、ホウ酸緩衝液を60 μL、AQC試薬を20 μL添加した。それぞれボルトックスミキサーで攪拌し、55°Cのブロックヒーターで10分間反応させ、誘導化した。

誘導化の完了した標準液およびサンプルを、RP-HPLCにて分析した。HPLC装置及び蛍光検出器には資生堂(株)のNANOSPACE SI-2を用いた。測定は、励起波長295 nm、蛍光波長350 nmで行った。

分析カラムには、COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column (4.6 mm i.d. × 250 mm, ナカライテスク (株)) を使用した。移動相には、0.1 %ギ酸緩衝液-アセトニトリル (60:40) を用い、流速は毎分 1.0 mL、カラム温度は 43°C、注入量は 10 μL で行った。Phe およ

び Tyr は、MS および LC/MS 分析のため、溶出液を採取した。

採取した Phe および Tyr を MS および LC/MS 分析にかけ、血中 ^{12}C -Phe/ ^{13}C -Phe および ^{12}C -Tyr/ ^{13}C -Tyr の比率を測定した。

表 10. 実験プロトコール

時刻	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
実験食	■	■	■	■	■	■	■	■		
^{13}C - Phe					○	○	○	○		
$\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$					◎					
Breath sample	◇				◇	◇	◇	◇	◇	◇

3. 結果

結果は、13 時の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を Pre 値とし、 $(\text{測定値} - \text{Pre 値}) / \text{kg BW}$ を算出し、 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ (‰) / kg BW により呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的変化を示した (図 3)。

たんぱく質摂取量が体重 1 kg あたり 0.2 g (0.2 g/kg BW) 時と 1.0 g (1.0 g/kg BW) 時の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、16 時以降、たんぱく質摂取量の少ない 0.2 g/kg BW 時では、1.0 g/kg BW 時と比較し、高い値で推移した。さらに、全てのたんぱく質摂取レベルで検討すると、16 時 30 分での呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量は、たんぱく質摂取量を増すに従い減少すると示された (図 4)。この結果より、たんぱく質摂取量を増すにつれ、アミノ酸の利用量が増したこと

で体内でたんぱく質合成量も増加したため、 ^{13}C -Phe の酸化量が減少し、呼気への $^{13}\text{CO}_2$ 排出量も減少したと考えられた。IAAO 法による呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量測定より、たんぱく質必要量の評価が日本人成人男性においても可能であることが示唆された。

たんぱく質摂取量を体重 1 kg あたり 0.4 g の時と 0.8 g の時の血中 Phe の $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 比は両群を比較し有意な差を認めなかった (図 5)。同様に、血中 Tyr の $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 比も両群を比較し有意な差を認めなかった (図 6)。この結果より、Phe と Tyr を一定量経口摂取することで、血中 Phe および Tyr の $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 比は、たんぱく質摂取量に依存しないことが示された。

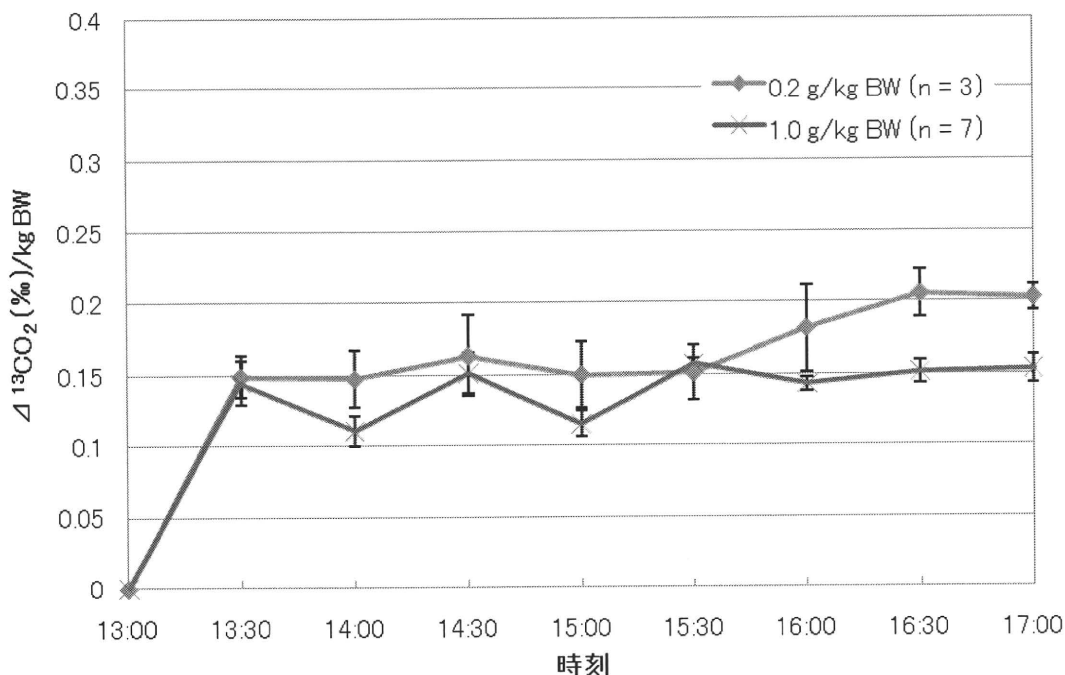


図 3. たんぱく質摂取量が 0.2 g/kg BW 時と 1.0 g/kg BW 時の IAAO 法による呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量の経時的変化

結果は mean ± SE で示した。

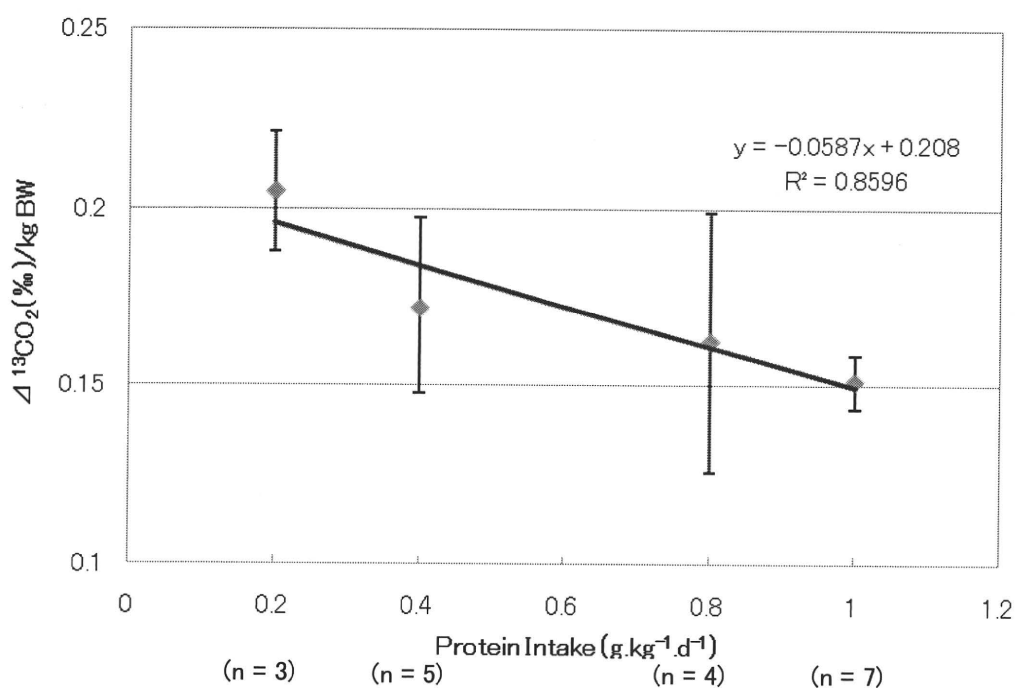


図 4. たんぱく質摂取レベルによる呼気中 ¹³CO₂ 量の変化
 値は 16 時 30 分の Δ¹³CO₂ (%)/kg BW を用いた。
 結果は mean ± SE で示した。

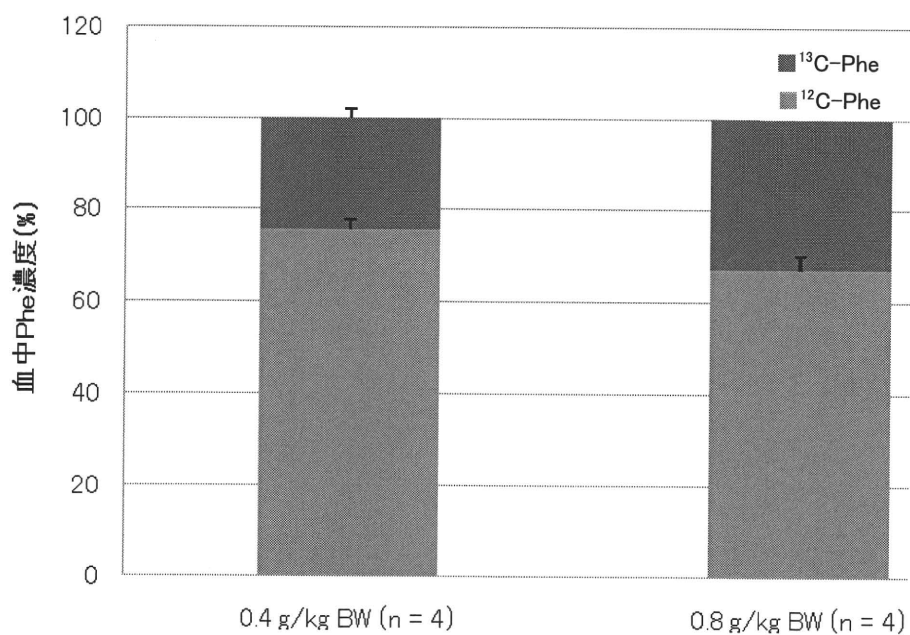


図 5. 血中 ¹²C-Phe/¹³C-Phe 比
 結果は mean + SE で示した。

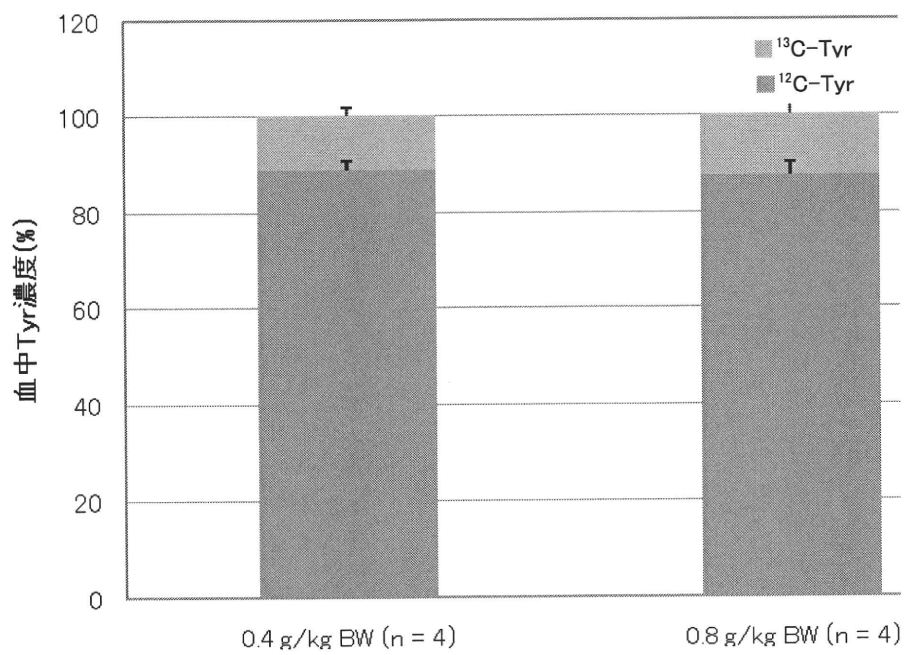


図 6. 血中 $^{12}\text{C-Tyr}/^{13}\text{C-Tyr}$ 比
結果は mean + SE で示した。

D. 考察

本研究ではまず、食事摂取後の呼気中¹³CO₂量の経時的変化について検討した。その結果、呼気中¹³CO₂量は、エネルギー摂取量に関わらず実験開始240分後から安定することが示された。本研究結果は、Brossら⁶⁾の実験食摂取による呼気中¹³CO₂量が、実験開始225分後から安定するとの報告とほぼ一致している。このことより、IAAO法における実験開始240分後以降の呼気中¹³CO₂量の変化は、食事摂取による影響を受けていないと考えられた。

次に、NaH¹³CO₃経口摂取後の呼気中への¹³CO₂の排出経過を検討した。その結果、NaH¹³CO₃吸収後、体内で発生した¹³CO₂は、経口摂取後10分前後を最大値とし、呼気へと速やかに排出されることが示された。このことより、IAAO法において、経口摂取した¹³C-Pheの酸化により発生した¹³CO₂は、呼気として速やかに排出されることが考えられた。

これら2つの結果をもとに、アミノ酸混合物をたんぱく質源とするIAAO法での呼気中¹³CO₂量の測定は、¹³C標識物質の経口摂取を開始する実験開始240分後から30分ごとに行うこととした。

アミノ酸混合物をたんぱく質源としたIAAO法の実験プロトコールは先行研究⁵⁾と同じとした。基礎研究より、NaH¹³CO₃経口摂取により体内で発生した¹³CO₂は、経口摂取後10分には呼気として排出されていることが示された。また、アミノ酸は経口摂取後30分程度で吸収される。そのため、実験食摂取が終了した30分後である16時30分の呼気中¹³CO₂量には、実験食中に含まれる全てのたんぱく質を吸収した結果が反映されて

いると考えた。そこで、16時30分の呼気中¹³CO₂量をたんぱく質摂取レベルで比較した。その結果、呼気中¹³CO₂量は、たんぱく質摂取量が最も少ない0.2 g/kg BW時に最大となり、たんぱく質摂取量を増すにつれて減少する傾向がみられた。たんぱく質摂取レベルを0.2 g/kg BWから少し高い0.4 g/kg BWへ増加させると摂取量の増加に伴い、アミノ酸のたんぱく質合成への利用量は増加する。IAAO法はこのアミノ酸代謝の反応を利用した方法であるため、たんぱく質摂取量に関わらず一定量経口摂取した¹³C-Pheのたんぱく質合成への利用量が、呼気中¹³CO₂量の違いとして反映されたと考えられた。

血中PheおよびTyrの¹²C/¹³C比は、たんぱく質摂取量の違いに影響されないことが示された。また、¹³C-Tyrの割合が¹²C-Tyrと比較し低かったことより、Tyrを一定量経口摂取することで、Tyrの代謝プールが満たされ、¹³C-Pheからの¹³C-Tyrの代謝物への損失は少なかったと考えられる。よって、Pheの酸化により発生したCO₂の¹²CO₂/¹³CO₂比もたんぱく質摂取量に関わらず、常に同程度であったと考えられた。

本研究では、血中PheおよびTyrの¹²C/¹³C比にたんぱく質摂取量の違いによる変化はみられなかった。しかし、呼気中¹³CO₂量が、たんぱく質摂取量依存的に変化したのは、たんぱく質合成に利用されなかった余剰の¹³C-Pheが血中に留まらずに酸化され、呼気中へ排出された結果だと考えられた。現在、たんぱく質摂取レベルは4ポイントであるが、今後、たんぱく質摂取レベルを増やしてIAAO法を行うことで、先行研究⁵⁾で報告されている呼気中¹³CO₂量の変曲点を得られる

可能性が示唆された。

本研究での検討より、たんぱく質摂取レベルを変化させると呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量がそれに伴い変化し、体内でのたんぱく質代謝を反映していることが考えられた。そのため、日本人成人男性においても、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定することによりたんぱく質必要量の不足や充足の評価ができる可能性が示唆された。

IAAO 法は、実験期間が短期間であること、生体試料として被験者の呼気を利用するので、測定者および被験者への負担が少ないこと等から、たんぱく質必要量の簡便な算出方法になるのではないかと考えられた。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Rose WC. The amino acid requirements of adult man. *Nutr Abst Rev* (1957) **27**, 631-647
2. Rand WM, Pellet PL, Young VR. Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *Am J Clin Nutr* (2007) **77**, 109-127
3. Hegsted DM. Balance studies. *J Nutr* (1976) **106**, 307-311
4. 岸恭一, 木戸康博: タンパク質・アミノ酸の新栄養学. 講談社, 東京, (2007)
5. Humayun MA, Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Reevaluation of the protein requirement in young men with the indicator amino acid oxidation technique. *Am J Clin Nutr* (2007) **86**, 995-1002
6. Bross R, Ball RO, Pencharz PB. Development of a minimally invasive protocol for the determination of the phenylalanine and lysine kinetics in humans during the fed state. *J Nutr* (1997) **128**, 1913-1919
7. 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討報告書: 日本人の食事摂取基準 [2010年版]. 第一出版株式会社, 東京, (2009)
8. Inoue MA, Ohtsuki K, Nakamura Y, Park Y, Iwai K, Morimitsu F, Sato K. Improvement in isolation and identification of food-derived peptides in human plasma based on precolumn derivatization of peptides with phenylisothiocyanate. *J Agric Food Chem* (2006) **54**, 5261-5266

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準の改定と活用に資する総合的研究

主任研究者 徳留 信寛 国立健康・栄養研究所 理事長

II. 研究分担者の報告書

5. 「日本人の食事摂取基準（2010 年版）」における妊婦・授乳婦の 水溶性ビタミン付加量の妥当性の検討

研究分担者	柴田 克己	滋賀県立大学	教授
研究協力者	福渡 努	滋賀県立大学	准教授

研究要旨

「日本人の食事摂取基準（2010 年版）」では、妊娠、授乳による必要量の増加分を補うため、水溶性ビタミンの付加量が設定されている。しかし、付加量の妥当性を検討した調査データは無い。そこで、妊婦、授乳婦を対象とした調査を行い、水溶性ビタミンの付加量の妥当性について検討した。のべ 169 名の妊婦と授乳婦を対象として自記式食事歴法質問票（DHQ）を用いた食事調査および 24 時間蓄尿を実施した。妊娠期を初期（16 週未満）、中期（16～28 週未満）、末期（28 週以降）に、授乳期を出産後 0～5 か月（前期）と 6～11 か月（後期）に分けた。各時期における水溶性ビタミンの摂取量を推定平均必要量（EAR）と、尿中排泄量を当研究室で定めた「健康を維持するための目標排泄量」と比較した。妊娠期の全ての時期において、ビタミン B₆ と葉酸の平均摂取量は EAR に対してそれぞれ 60% と 70% であった。一方、生体指標であるビタミン B₆ と葉酸の尿中排泄量は全ての時期で目標排泄量以上の値となった。ビタミン B₆ と葉酸の摂取量は EAR に達していなかったが、体内の栄養状態は良好であると考えられた。このことから、妊娠期におけるビタミン B₆ と葉酸の付加量が高い可能性が示された。

A. 目的

妊娠期および授乳期の食生活は、本人に加えて児のライフステージの最も初期段階での栄養状態を形づくるものとして重要である。この為、日本人の食事摂取基準（2010年版）¹⁾では、水溶性ビタミンの付加量が設定された。妊婦においては胎児発育に伴うビタミンの代謝特性の変化、授乳婦においては授乳によるビタミンの損失が根拠となっている。

しかし、設定した付加量が妊婦、授乳婦にとって真の必要量を反映できているのかどうか判断できる調査データは無い。そこで、妊婦、授乳婦を対象として調査を行い、食事摂取基準における水溶性ビタミンの付加量の妥当性を検討した。

妥当性の検討にあたり、対象者の水溶性ビタミンの摂取量と食事摂取基準の推定平均必要量（EAR）を比較した。また、対象者が現在の摂取量で体内のビタミン栄養状態が良好に保たれているかどうかを判断する必要がある。我々はこれまでに、体内の水溶性ビタミンの栄養状態は生体指標の尿中排泄量で評価できる事を明らかにした。また、ヒト介入試験によって、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を明らかにした^{2, 3)}。自由に日常生活を営んでいるヒトを対象とした調査においても、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の間に関連を認め^{4, 6)}。以上を踏まえて、尿中排泄量を評価する値として目標排泄量を定めた⁷⁾。対象者の水溶性ビタミンの尿中排泄量が目標排泄量を上回っていれば、体内の栄養状態は良好に保たれているとした。

本研究では、妊娠期および授乳期における

水溶性ビタミンの摂取量と栄養状態の現状を把握することを目的として、すでに妥当性が確立されている自記式食事歴法質問票（DHQ）⁸⁻¹⁰⁾を用いて日本人妊婦および授乳婦を対象とした食事調査を行い、尿中水溶性ビタミン排泄量との関係について検討した。

B. 方法

1. 対象者

滋賀県の子育て支援サークルを介して妊婦および授乳婦を募集した。のべ 176 名が調査に継続的に参加し、169 名から回答および 24 時間尿を得た。授乳婦は出産後、子供が満 1 歳になるまでを対象期間とした。妊娠 16 週未満を妊娠初期、妊娠 16～28 週未満を妊娠中期、妊娠 28 週以降を妊娠末期、出産後 0～5 か月の授乳婦を授乳前期、出産後 6～11 か月の授乳婦を授乳後期とした。

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、個人情報の保護などについて説明を行い、インフォームド・コンセントを得た。

2. 調査期間

2010 年 4 月～2011 年 2 月に行った。

3. 食事調査

対象者には設定した調査日に DHQ に回答してもらった。これを五訂日本食品標準成分表¹¹⁾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合成されるため、ナイアシン当量の摂取量として算出した。

4. 採尿

対象者に 24 時間尿を採取してもらった。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、採尿時刻、終了時刻、尿の取りこぼし、取りこぼした量、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处理し、使用するまで-20°Cで保存した。

5. 分析

尿中チアミン量を尿中ビタミン B₁ 排泄量とした。尿中チアミン量を測定するために、尿 9 mL に 1 mol/L HCl を 1 mL 加えて安定化した。この尿を HPLC による分析に供した¹²⁾。

尿中リボフラビン量を尿中ビタミン B₂ 排泄量とした。尿中リボフラビン量を測定するために、尿 9 mL に 1 mol/L HCl を 1 mL 加えて安定化した。この尿を HPLC による分析に供した¹³⁾。

ピリドキシン代謝産物 4-ピリドキシン酸 (4-PIC) の尿中排泄量を尿中ビタミン B₆ 排泄量とした。尿中 4-PIC 量を測定するために、尿 9 mL に 1 mol/L HCl を 1 mL 加えて安定化した。この尿を HPLC による分析に供した¹⁴⁾。

尿中ビタミン B₁₂ 量を求めるために、尿 900 μL に 180 μL の 100 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.8)、水 680 μL、0.025%シアン化カリウム溶液 20 μL を加え、120°C で 5 分間オートクレーブ処理した。氷冷後、20 μL の 10%メタリン酸溶液を加え、遠心分離によって上清を得た。*Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法にこの上清を供した¹⁵⁾。

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) の合計を尿中ナイアシン量とした。尿中ナイアシン量を測定するために、尿 9 mL に 1 mol/L HCl を 1 mL 加えて安

定化した。この尿を HPLC 法に供し、尿中ニコチンアミド、2-Py、4-Py 各含量を測定した¹⁶⁾。また、尿中 MNA 含量を HPLC 法で測定した¹⁷⁾。

尿中パントテン酸量を測定するために、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いた微生物学的定量法に尿を供した¹⁸⁾。

尿中葉酸量を測定するために、尿 9 mL に 1 mol/L アスコルビン酸溶液を 1 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にこの尿を供した¹⁹⁾。

アスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸、2,3-ジケトグルロン酸の合計を尿中ビタミン C 量とした。尿中ビタミン C 量を測定するために、尿 5 mL に 10%メタリン酸溶液 5 mL を加えて安定化した。この尿を HPLC による分析に供した²⁰⁾。

C. 結果

1. 対象者の特徴

妊娠初期 (妊娠 16 週未満)、妊娠中期 (妊娠 16~28 週未満)、妊娠末期 (妊娠 28 週以降)、授乳前期 (出産後 0~5 か月)、授乳後期 (出産後 6~11 か月) における対象者の身体的特徴と栄養素等摂取量を表 1 に示した。

栄養素等摂取量では、総エネルギーは妊婦、授乳婦ともに食事摂取基準の推定エネルギー必要量よりも低値を示した。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. 水溶性ビタミン平均摂取量

DHQ を用いて算出したビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、ビタミン C の摂